



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ευθυμία Πετεινάκη

Διδακτορική Διατριβή

**«MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ»**

υπό

ΦΛΩΡΟΥ Α. ΖΩΗΣ

Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2020

© 2020 ΦΛΩΡΟΥ ΖΩΗ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5^η/01-04-2009 ΓΣΕΕ):

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπουσα)** **Ευθυμία Πετεινάκη,**
Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** **Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** **Ζωή Δανιήλ**
Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** **Επαμεινώνδας Ζακυνθινός**
Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** **Ιωάννης Πανταζόπουλος**
Επίκουρος Καθηγητής Επείγουσας Ιατρικής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** **Φωτεινή Μάλλη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Νοσηλευτικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** **Χρυσή Χατζόγλου**
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα της διατριβής μου Καθηγήτρια κ. Πετεινάκη Έφη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας που με τίμησε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο της και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την έμπρακτη και συνεχή υποστήριξη της, την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση της, την αμέριστη βοήθεια της, τις πολύτιμες συμβουλές της, τις εύστοχες παρατηρήσεις της και ενθάρρυνση για την επίτευξη του βέλτιστου δυνατού αποτελέσματος. Όλα αυτά τα χρόνια ο επαγγελματισμός της, η μεθοδικότητα και η επιμονή της αποτελέσαν για μένα πηγή έμπνευσης. Η συνεργασία μαζί της ήταν μια από τις σημαντικότερες, πολύτιμες και ωραιότερες εμπειρίες της ζωής μου.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής τον κ. Γουργουλιάνη Κωνσταντίνο., Καθηγητή Πνευμονιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κ. Δανιήλ Ζωή, Καθηγήτρια Πνευμονολογίας του Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για το ενδιαφέρον τους, την επίβλεψη της εργασίας μου, τις χρήσιμες συμβουλές τους και το χρόνο που αφιέρωσαν για την ολοκλήρωση της.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της Επιτροπής Παρακολούθησης, τον Καθηγητή κο Ζακυνθινό Επαμεινώνδα, τον Επίκουρο Καθηγητή κο Πανταζόπουλο Ιωάννη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μάλλη Φωτεινή και την κα Καθηγήτρια κα Χατζόγλου Χρυσή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Βασδέκη Αφροδίτη, Βιοπαθολόγο Διευθύντρια ΕΣΥ, για την αμέριστη βοήθεια της στην διεκπεραίωση των πειραμάτων, τις πολύτιμες συμβουλές της, το ειλικρινές και διαρκές ενδιαφέρον της, την υποστήριξη της και την αμείωτη προθυμία της να απαντήσει στους προβληματισμούς μου. Επιπλέον, ευχαριστήσω θερμά την κ. Γερογιάννη Ειρήνη, Πνευμονολόγος, Διευθύντρια ΕΣΥ για την άψογη συνεργασία μας και το υλικό που μου προσέφερε.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα νεότερα και παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, Δήμητρα Κλάψα, Στυλιαννή Σάρρου, Ιωάννα Βουλγαρίδη καθώς και μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Λίτσα Καραμούτη, Ειρήνη Σεβδαλή και Γερασιμίνα Τσιντή για την άριστη και αρμονική συνεργασία που είχαμε, τις επιστημονικές γνώσεις που μοιραστήκαμε και την αμέριστη βοήθεια τους. Θα ήταν παράλειψη μου να μην αναφερθώ στην κ. Γκουτζίδου Μαίρη, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για τη βοήθεια της στη συλλογή και στην πρωτογενή επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων και για την άψογη συνεργασία μας. Η παρούσα εργασία ήταν πραγματικά ένα υπέροχο ταξίδι...Όλα αυτά τα όμορφα χρόνια μου δόθηκε η ευκαιρία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με αξιόλογους ανθρώπους και επιστήμονες, να ζήσω ωραίες εμπειρίες και να δημιουργήσω αληθινές φιλίες. Σαν τα λόγια του ποιητή «Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη, να εύχεσαι νάναι μακρύς ο δρόμος, γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις...Αλλά μη βιάζεις το ταξίδι διόλου. Καλλίτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει...Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα, ήδη θα το κατάλαβες η Ιθάκες τι σημαίνουν».

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στο στήριγμα της ζωής μου, στον σύζυγό μου, Γιώργο Θώμο, για την συναισθηματική στήριξη του, την πολύτιμη βοήθεια του, την κατανόηση του, την εμπιστοσύνη του στις δυνατότητες μου, την αισιοδοξία του, την ενθάρρυνση του και την ανεξάντλητη υπομονή του στις πολυάριθμες ώρες ενασχόλησής μου με τη διατριβή. Χωρίς την στήριξη του, την αγάπη του και την φροντίδα του δεν θα τα είχα καταφέρει. Ένα πολύ πολύ μεγάλο ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου οφείλω στις δυο μεγαλύτερες αγάπες της ζωής μου, τα παιδιά μου, Λουκά και Μαριάννα, για την υπομονή και ηρεμία που έδειξαν κατά τη συγγραφή της διατριβής μου και ένα μεγάλο συγνώμη για το χρόνο που στερήθηκαν μαζί μου. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στους γονείς μου, Θανάση και Θεοδώρα, για όλα όσα έχουν προσφέρει για μένα και που συνεχίζουν να προσφέρουν με υπομονή και αγάπη, πάντα είναι δίπλα μου. Η κατανόηση τους, η συνεχής ενθάρρυνση τους, η αμέριστη στήριξη τους, η συμπαράσταση τους και η πίστη τους στις δυνατότητές μου σε κάθε βήμα και στάδιο της ζωής μου δίνουν δύναμη και θάρρος να προσπαθώ και να μην υποκύπτω στις δυσκολίες. Σε αυτούς τους δυο ανθρώπους και στον σύζυγο μου οφείλω την επιτυχή

διεκπεραίωση της εργασίας μου και όλα όσα έχω πετύχει μέχρι σήμερα. Τέλος, ευχαριστώ ολόψυχα τους θείους μου Μαρία και Βασίλη, την αδερφή μου, Γεωργία και την ξαδέρφη μου, Ζωή, για την συμπαράσταση τους και την υποστήριξη τους στην πραγματοποίηση της διατριβής μου, άλλα και για τη συνεχή ενθάρρυνση και στήριξη τους σε κάθε μου βήμα.

Ζωή Φλώρου

*Στον άντρα μου,
τα παιδιά μου
και τους γονείς μου*

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΦΛΩΡΟΥ ΖΩΗ

Ημερομηνία γέννησης: 17/4/1984

Τόπος γέννησης: Λάρισα

Υπηκοότητα: Ελληνική

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμη, μητέρα δύο παιδιών

Τηλέφωνα επικοινωνίας: 6981452716, 2410417267

e-mail: zoi_fl@yahoo.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2019: Υποψήφια διδάκτωρ του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θέμα διατριβής: «*Mycobacterium tuberculosis*: αντοχή στα αντιφυματικά και διερεύνηση της αντοχής», Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια κ. Έφη Πετεινάκη

2010: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας – Μοριακή Γενετική. Διαγνωστικοί Δείκτες», Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με βαθμό «Λίαν Καλώς»

2008: Πτυχίο Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με βαθμό «Λίαν Καλώς»

ΞΕΝΗ ΓΛΩΣΣΑ

Αγγλικά (Άριστη γνώση LRN Level 3 Certificate in ESOL International (CEF C2, Proficiency))

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

17/1/2009-σήμερα: Επιστημονικός συνεργάτης στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Διευθύντρια Ε. Πετεινάκη

17/04/2020-σήμερα: Σύμβαση ορισμένου χρόνου στην Περιφέρεια Θεσσαλίας με απόσπαση στο ΠΓΝΛ, για την κάλυψη των αναγκών που προέκυψαν από την εμφάνιση και την ανάγκη περιορισμού της διασποράς του COVID19.

08/04/2020-31/12/2020: Απασχόληση με σύμβαση έργου στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο πρόγραμμα (Κωδ 3811) «Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Μοριακή Διάγνωση του νέου κορωνοϊού», Επιστημονική υπεύθυνη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας: Ε. Πετεινάκη

4/4/2016-σήμερα: Απασχόληση στον ιδιωτικό τομέα. ANIMUS A.E. (Κέντρο Αποθεραπείας και Αποκατάστασης)

01/01/2014-30/11/2015: Απασχόληση με σύμβαση έργου στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τ.Ε.Ι. Θεσσαλίας, στο πλαίσιο της πράξης Αρχιμήδης ΙΙΙ στο υποέργο 06: «Γενετική ανάλυση, μοριακή επιδημιολογία και μελέτη ανθεκτικότητας ανθρωπίνων στελεχών ιού γρίπης τύπου Α», Επιστημονικός υπεύθυνος Α. Μανούρας

01/01/2014-30/06/2014: Απασχόληση με σύμβαση έργου στο εργαστήριο Ανασολογίας & Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε ερευνητικό πρόγραμμα (Κωδ 3116) «Ανοσολογική Έρευνα», Επιστημονικοί υπεύθυνοι Α. Γερμενής-Μ. Σπελέτας

19/03/2013-12/07/2013: Εργαστηριακός συνεργάτης στο τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων του Τ.Ε.Ι. Λάρισας. Μάθημα διδασκαλίας: «Μυκητολογία» (8ώρες/εβδομάδα)

01/04/2012-30/09/2013: Απασχόληση με σύμβαση έργου στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο ερευνητικό πρόγραμμα (Κωδ.4063) «Εργαστηριακή κάλυψη της νέας γρίπης Α Η1Ν1», Επιστημονική υπεύθυνη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας: Ε. Πετεινάκη

1/10/2010-2/7/2011: Εργαστηριακός συνεργάτης στο τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων του Τ.Ε.Ι. Λάρισας. Μάθημα διδασκαλίας: «Μυκητολογία» (8ώρες/εβδομάδα)

01/07/2010-31/12/2011: Απασχόληση με σύμβαση έργου στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο ερευνητικό πρόγραμμα (Κωδ.4063) «Εργαστηριακή κάλυψη της νέας γρίπης Α Η1Ν1», Επιστημονική υπεύθυνη, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας: Ε. Πετεινάκη

1/8/2009-31/8/2010: Επιστημονικός συνεργάτης στο κέντρο αναφοράς γρίπης Η1Ν1 του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Διευθύντρια: Καθηγήτρια Ε. Πετεινάκη

ΒΡΑΒΕΙΑ/ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Μάιος 2013: Συμμετοχή με υποτροφία από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) σε πρόγραμμα μετεκπαίδευσης με τίτλο «Gaining Expertise on Mycobacterial Infections», Παρίσι, Γαλλία

Ιούλιος 2012: Συμμετοχή με υποτροφία από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) στο θερινό σχολείο «11th ESCMID Summer School», Ινσμπρουκ, Αυστρία

Νοέμβριος 2009: Έπαινος Καλύτερης Ανακοίνωσης για την εργασία «Εφαρμογή της ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR στη διάγνωση του αιτιολογικού παράγοντα των παραπνευμονικών συλλογών» από την οργανωτική επιτροπή του 18ου Πανελληνίου Συνεδρίου Νοσημάτων Θώρακος, Αθήνα, Ελλάδα

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Gkavarella L, **Florou Z**, Papadimitriou-Olivgeris M, Kontos F, Foka A, Vasdeki A, Kolonitsiou F, Charokopos N, Karkoulas K, Marangos M, Anastassiou E, Zerva L, Petinaki E, Spiliopoulou I. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex strains: a multicenter retrospective Greek study. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*, 2019 January, ISSN 2578-0190
2. Sarrou S, Malli E, Tsilipounidaki K, **Florou Z**, Medvecky M, Skoulakis A, Hrabak J, Papagiannitsis CC, Petinaki E. MLSB-Resistant Staphylococcus aureus in Central Greece: Rate of Resistance and Molecular Characterization. *Microb Drug Resist*. 2019 May;25(4):543-550
3. Malli E, **Florou Z**, Tsilipounidaki K, Voulgaridi I, Stefos A, Xitsas S, Papagiannitsis CC, Petinaki E. Evaluation of rapid polymyxin NP test to detect colistin-resistant Klebsiella pneumoniae isolated in a tertiary Greek hospital. *J Microbiol Methods*. 2018 Oct; 153:35-39.
4. Tsea M, Lachanas V, **Florou Z**, Skoulakis A, Doumas S, Chatziioannou J, Petinaki E, Skoulakis Ch. Human Pappiloma Virus epidemiology and subtyping in Head and Neck

Squamous Cell Carcinoma by anatomical site in Central Greece. *Global Journal of Otolaryngology* Volume 16 issue 1-May 2018.

5. **Florou Z**, Pantelidi K, Fountas S, Skoulakis A, Petinaki E, Messini C, Lachanas V, Petinaki E. High Prevalence of Sexually Transmitted Infections (STIs) in Asymptomatic Greek Women. *Arch Clin Microbiol* 2018, 9:2
6. Skoulakis A, Lachanas V, **Florou Z**, Samara M, Mantzana-Petinelli M, Petinaki E, Skoulakis Ch. High-Prevalence of Various High-Risk Sub-types of Human Papilloma Virus in Patients with Acquired Cholesteatoma in Greece. *Acta Scientific Microbiology* Volume 1 Issue 4 April 2018
7. Papagiannitsis CC, Malli E, **Florou Z**, Medvecky M, Sarrou S, Hrabak J, Petinaki E., First description in Europe of the emergence of *Enterococcus faecium* ST117 carrying both *vanA* and *vanB* genes, isolated in Greece. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017 Dec; 11:68-70. doi: 10.1016/j.jgar.2017.07.010. Epub 2017 Jul 25.
8. Papagiannitsis CC, Malli E, **Florou Z**, Sarrou S, Hrabak J, Mantzarlis K, Zakyntinos E, Petinaki E. Emergence of sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and VIM-1 metallo- β -lactamases in a Greek hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Mar;87(3):295-297.
9. Ioannidis D, Lachanas VA, **Florou Z**, Bizakis JG, Petinaki E, Skoulakis CE. Herpes viruses and human papilloma virus in nasal polyposis and controls. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015 Nov-Dec; 81(6): 658-62.
10. Plakokefalos E, Vontas A, **Florou Z**, Valiakos Z, Georgantza K, Sarrou S, Labronikou M, Gramoustianou, Petinaki E, Markoulatos P, Minas A, Krikelis V, Noulas A, Manouras A. Molecular Epidemiology of human influenza viruses in Thessaly During 2014-2015. *The intener journal of Laboratory Medicine* vol. 6 number 1.
11. Plakokefalos E, Vontas A, **Florou Z**, Valiakos G, Georgantza K, Sarrou S, Labronikou M, Gramoustianou E, Petinaki E, Markoulatos P, Minas A, Krikelis V, Noulas A, Manouras A. Influenza virus genotypes circulating in central Greece during 2012-2014 and vaccine strain match. *The intener journal of Laboratory Medicine* vol. 13 number 1.
12. Plakokefalos E, Vontas A, **Florou Z**, Valiakos G, Georgantza K, Sarrou S, Labronikou M, Gramoustianou E, Petinaki E, Markoulatos P, Minas A, Krikelis V, Noulas A, Manouras

A. Influenza virus activity during pandemic and seasonal influenza in Central Greece. Influenza Virus Activity during Pandemic and Seasonal Influenza in Central Greece. The Internet Journal of Infectious Diseases. 2015 Volume 14 Number 1.

13. Ioannidis DG, Lachanas VA, **Florou Z**, Bizakis JG, Petinaki E, Skoulakis CE. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydomphila pneumoniae: a comparative study in patients with nasal polyposis and healthy controls. J Laryngol Otol. 2015 Sep;129(9):865-9.
14. Speletas M, Salzer U, **Florou Z**, Petinaki E, Daniil Z, Bardaka F, Gourgoulisanis KI, Skoulakis C, Germenis AE. Heterozygous alterations of TNFRSF13B/TACI in tonsillar hypertrophy and sarcoidosis. Clin Dev Immunol. 2013; 2013: 532437. doi: 10.1155/2013/532437.
15. Malli F, Bargiota A, Theodoridou K, **Florou Z**, Bardaka F, Koukoulis GN, Gourgoulisanis KI, Daniil Z. Increased primary autoimmune thyroid diseases and thyroid antibodies in sarcoidosis: evidence for an under-recognised extrathoracic involvement in sarcoidosis? Hormones (2012) Oct;11(4):436-43.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Διεθνή Συνέδρια: αρ.16

Πανελλήνια Συνέδρια: αρ.15

**«MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: ANTOXH STA ANTIΦΥΜΑΤΙΚΑ ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ANTOXHΣ»**

ΖΩΗ ΦΛΩΡΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Πετεινάκη Ευθυμία** Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
(Επιβλέπουσα)
- 2. Γουργουλιάνης Κωνσταντίνος** Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 3. Δανιήλ Ζωή** Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Mycobacterium tuberculosis* είναι ένα Gram θετικό βακτηρίδιο, οξεάντοχο και αλκαλοάντοχο, υποχρεωτικά αερόβιο, ακίνητο, με υψηλή περιεκτικότητα σε G+C. Είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της φυματίωσης, η οποία αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα δημόσιας υγείας με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα παγκοσμίως. Η πιο πρόσφατη έκθεση (2017) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) εκτιμά 10 εκατομμύρια νέα κρούσματα και 1,6 εκατομμύρια θάνατοι από φυματίωση. Η θεραπεία της είναι μεγάλης διάρκειας και αποτελείται από δύο φάσεις. Η αρχική φάση περιλαμβάνει ριφαμπικίνη (RIF), ισονιαζίδη (INH), πυραζιναμίδη (PZA), αιθαμβουτόλη (EMB) ως αντιφυματικούς παράγοντες πρώτης γραμμής. Η στρεπτομυκίνη (STR) ανήκει στα φάρμακα δεύτερης γραμμής, ωστόσο, εξακολουθεί να ενσωματώνεται σε θεραπευτικά σχήματα πρώτης γραμμής.

Τα τελευταία χρόνια, ο αυξανόμενος επιπολασμός της ανθεκτικής φυματίωσης (DR-TB), ειδικότερα της πολυανθεκτικής φυματίωσης (MDR-TB, ταυτόχρονη αντοχή σε INH και RIF) ή της εκτεταμένης αντοχής (ταυτόχρονη αντοχή σε INH και RIF με συνοδό αντοχή σε μία κινολόνη και σε ένα δευτερεύον αντιφυματικό, ή αμικασίνη, ή καπρεομυκίνη ή καναμυκίνη) αποτελεί μείζον πρόβλημα. Η άμεση εφαρμογή της αντιφυματικής θεραπείας είναι εξαιρετικά σημαντική όχι μόνο για την επιτυχή έκβαση της πορείας του ασθενούς αλλά και για τον περιορισμό της διασποράς του μικροοργανισμού στο περιβάλλον. Δυστυχώς ο χρόνος γενεάς του μυκοβακτηριδίου είναι μεγάλος και γι' αυτό η απομόνωση του και κατά συνέπεια ο έλεγχος ευαισθησίας του στα αντιφυματικά είναι εξαιρετικά χρονοβόρος. Η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών βοήθησε σημαντικά τόσο στην ταχεία ανίχνευση του μικροοργανισμού απευθείας στο κλινικό δείγμα όσο και στην ανίχνευση των κυριότερων μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός του ποσοστού αντοχής των στελεχών *M. tuberculosis*, που απομονώθηκαν από ασθενείς στην περιοχή της Θεσσαλίας, ο χαρακτηρισμός των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την έκφραση αντοχής και η διερεύνηση της ύπαρξης πολυμορφισμών για επιδημιολογικές μελέτες.

Τα στελέχη *M. tuberculosis* Complex (MTBC) που μελετήθηκαν απομονώθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) από νοσηλευμένους ασθενείς την περίοδο 2009-2017. Η απομόνωση και ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με φαινοτυπικές μεθόδους και με μοριακές μεθόδους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα πρώτης και δεύτερης γραμμής με τη μέθοδο αναφοράς σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960, με την μέθοδο μικροαραιώσεων σε υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H10 και με τη μέθοδο E-test. Η μοριακή τυποποίηση βασίστηκε στις μοριακές μεθόδους γονοτύπησης MST και MIRU-VNTR. Παράλληλα, ελέγχθηκαν για πιθανές μεταλλάξεις 35 γονίδια σχετιζόμενα με αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα και ακολούθησε διάκριση των μεταλλάξεων από τους πολυμορφισμούς.

Από τα 265 απομονωμένα στελέχη MTBC, τα 37 (13,96%) ήταν ανθεκτικά στα αντιφυματικά φάρμακα, εκ των οποίων τα 31 ήταν *M.tuberculosis/M. canettii* και τα 6 *M. bovis*. Ο έλεγχος ευαισθησίας δεν ανέδειξε MDR-TB και XDR-TB στελέχη. Τα ποσοστά αντοχής των *M. tuberculosis/ M. canettii* ανήλθαν σε 6% στη STR, 5,2% στη INH, 1,5% στην PZA, 1,1% στην EMB και 0,4% στη RIF, ενώ τα *M. bovis* ήταν όλα ανθεκτικά μόνο στην PZA. Για περαιτέρω χαρακτηρισμό επιλέχθηκαν τυχαία επιπλέον 17 ευαίσθητα στελέχη *M. tuberculosis/ M. canettii*. Η πλειοψηφία των στελεχών απομονώθηκε από άντρες ασθενείς, Έλληνες άνω των 60 και αλλοδαπών μεταξύ 20-40ετών. Βάση της μεθόδου MIRU-VNTR, τα στελέχη ανήκαν στις οικογένειες Haarlem (33,3%). Τα εναπομείναντα στελέχη χαρακτηρίστηκαν από τους ακόλουθους γονοτύπους S-type (16,7%), Beijing (12,5%), X-type (4,2%), CAS/Delhi (2,1%), LAM (2,1%), Tur (2,1%), και δεκατρία στελέχη αταξινόμητα (unclassified) (27%). Βάση της μεθόδου MST, τα στελέχη διανέμονταν σε γνωστούς κλωνικούς τύπους ST6 (20,8%), ST13 (14,6%), ST3 (12,5%), ST23 (10,4%) , ST26 (8,3%), ST4 (6,3%), ST42 (2,1%), ST77 (2,1%), ST81 (2,1%), και σε νέους ST85 (2,1%), ST86 (2,1%), ST87 (2,1%), ST88 (4,2%), ST89 (4,2%), ST90 (2,1%), ST91(2,1%), ST92 (2,1%). Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των προφίλ ST και της αντοχής στα αντιφυματικά. Από τη συσχέτιση των δυο μεθόδων προέκυψε ως κυρίαρχη η γενεολογία Euro-American (lineage 4). Ο μοριακός έλεγχος των γονιδίων ανέδειξε γνωστές άλλα και νέες μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή στα υπό μελέτη αντιφυματικά φάρμακα. Οι

μεταλλάξεις (γονίδια *katG*, *inhA*, *mabA* και στους υποκινητές των γονιδίων *inhA* και *ahpC*) σχετιζόμενες με αντοχή στην INH εντοπίστηκαν σε ποσοστό 85,7% των στελεχών. Ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι μικρό ποσοστό των INH-ανθεκτικών στελεχών έφεραν τις πιο κοινές μεταλλάξεις S315T και c-15t, ενώ νέες ή λιγότερο συχνές ανιχνεύθηκαν σε αυτά. Τα στελέχη με αντοχή στην STR έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια *rpsL* και *gidB* σε ποσοστό 81,25%. Φυλογενετικοί πολυμορφισμοί βρέθηκαν σε δεκατέσσερα γονίδια κατά τη μοριακή ανάλυση και σχετίστηκαν με συγκεκριμένους ST τύπους, οικογένειες MIRU-VNTR καθώς και με στελέχη *M. bovis*. Η μελέτη αυτή αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα της εξέλιξης των μηχανισμών αντοχής στα αντιφυματικών φαρμάκων των στελεχών *M. tuberculosis*.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis is an immobile, obligate aerobic, acid-fast bacillus and belongs to the high G+C Gram-positive bacteria. It is the causative agent of tuberculosis, which is one of the major public health problems with high morbidity and mortality worldwide. A recent report by the World Health Organization (WHO) estimated 10.0 million new cases and 1.6 million deaths from TB in 2017 from tuberculosis. Its treatment is long and consists of two phases. The initial phase includes rifampicin (RIF), isoniazid (INH), pyrazinamide (PZA), ethambutol (EMB) as first-line anti-tuberculosis agents. Streptomycin (STR) is a second-line drugs, however, it is still incorporated into first-line regimens.

In recent years, the increasing prevalence of drugs resistant tuberculosis (DR-TB), especially multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB, resistant to both INH and RIF) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB, resistant to isoniazid and rifampin, plus any fluoroquinolone and at least one of second-line drugs, amikacin or kanamycin or capreomycin) is a major problem. The immediate treatment is extremely important not only for the successful outcome of the patient but also for the reduction of the spread of the *M. tuberculosis* in the environment. Unfortunately, the generation time of the mycobacterium is long and that is why its isolation and its drug susceptibility testing are time consuming. The molecular techniques play important roles in both the direct detection of the *M. tuberculosis* in the clinical sample and the detection of the main mutations associated with resistance.

The aim of this study was to determine the resistance rate of *M. tuberculosis* strains, isolated from patients in Thessaly, the characterization of mutations associated with drug resistance and to investigate the polymorphisms for epidemiological studies.

M. tuberculosis Complex (MTBC) isolates were isolated from patients in the Microbiological Laboratory of the University General Hospital of Larissa during 2009-2017. Isolation and identification of strains were done by phenotypic methods and molecular methods. Subsequently, drug susceptibility testing for first- and second-line TB drugs was performed using the reference method BACTEC MGIT 960, the microdilution method

(Sensititre) and the E-test method. Two molecular genotyping methods were used, MST and MIRU-VNTR. At the same time, mutations in genes associated with drug resistance to tuberculosis were detected and were differentiated from polymorphisms.

Out of the 265 MTBC isolates, 37 (13.96%) were resistant to TB drugs, of which 31 were identified as *M. tuberculosis*/*M. canettii* and 6 as *M. bovis*. None of MTBC stains were MDR and XDR. Resistance rates of *M. tuberculosis* / *M. canettii* strains were 6% in STR, 5.2% in INH, 1.5% in PZA, 1.1% in EMB and 0.4% in RIF. All *M. bovis* strains were resistant only to PZA. Additional, 17 susceptible strains of *M. tuberculosis* / *M. canettii* were randomly selected for further characterization.

Most of the stains were isolated from male patients, Greeks over 60 and foreigners between 20-40 years old. Based on the MIRU-VNTR method, the most prevalent genotype was Haarlem (33.3%), following the genotypes S-type (16.7%), Beijing (12.5%), X-type (4.2%), CAS / Delhi (2.1%), LAM (2, 1%), Tur (2.1%). Thirteen isolates were unclassified (27%). Based on the MST method, the strains classified into known MST groups: ST6 (20.8%), ST13 (14.6%), ST3 (12.5%), ST23 (10.4%), ST26 (8.3%), ST4 (6.3%), ST42 (2.1%), ST77 (2.1%), and into new ST profiles: ST81 (2.1%), ST85 (2.1%), ST86 (2.1%), ST87 (2.1%), ST88 (4.2%), ST89 (4.2%), ST90 (2.1%), ST91 (2.1%), ST92 (2.1%). There was no correlation between ST profiles and the resistance mutation patterns. The combination of two methods detected that the dominant lineage was the Euro-American.

New and known mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance identified. Mutations associated with resistance to isoniazid (*katG*, *inhA*, *mabA* genes and in promoter region of *inhA* and *ahpC* genes) were detected in 85.7% of isolates. An interesting finding was that a small percentage of INH-resistant strains carried the most common mutations S315T and c-15t, while new or fewer common ones were detected in them. STR-resistant strains carried 81.25% mutations in the *rpsL* and *gidB* genes. Phylogenetic polymorphisms of fourteen genes were found during molecular analysis and were associated with specific ST types, MIRU-VNTR families as well as *M. bovis* strains. This study reveals the complexity of the mechanisms of *M. tuberculosis* drug resistant strains.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	26
1.1 Ιστορική αναδρομή	27
1.2 Επιδημιολογία.....	29
1.3 Ταξινόμηση	32
1.4 Χαρακτηριστικά.....	36
1.5 Κυτταρικό τοίχωμα.....	38
1.6 Μετάδοση-Πηγές μόλυνσης.....	42
1.7 Λοιμώξεις	43
1.8 Διάγνωση	44
1.8.1 Συλλογή και μεταφορά κλινικών δειγμάτων	45
1.8.2 Μικροσκόπηση.....	45
1.8.3 Καλλιέργεια.....	47
1.8.4 Δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά με κλασικές μεθόδους	49
1.8.5 Μοριακές τεχνικές.....	50
1.9 Θεραπεία φυματίωσης.....	54
1.10 Αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα.....	58
1.10.1 Ενδογενής αντοχή.....	58
1.10.2 Σχέση μεταξύ εγγενούς αντοχής και γενετικής αντοχής.....	59
1.10.3 Επίκτητη αντοχή	60
1.10.4 Αντοχή στην ισονιαζίδη.....	61
1.10.4.α Γονίδιο <i>katG</i>	62

1.10.4.β Γονίδιο <i>inhA</i> και περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου (<i>mabA-inhA</i>).....	64
1.10.4.γ Διαγονιδιακή περιοχή <i>furA-katG</i> και γονίδιο <i>furA</i>	66
1.10.4.δ Διαγονιδιακή περιοχή <i>oxyR-ahpC</i> και γονίδια <i>ahpC</i> και <i>oxyR</i>	67
1.10.4.ε Γονίδιο <i>mshA</i>	70
1.10.4.στ Γονίδιο <i>nhoA</i> (ή αλλιώς γονίδιο <i>nat</i>).....	71
1.10.4.ζ Γονίδιο <i>ndh</i>	72
1.10.5 Αντοχή στην ριφαμπικίνη	78
1.10.6 Αντοχή στην αιθαμβουτόλη	80
1.10.7 Αντοχή στη πυραζιναμίδη	84
1.10.8 Αντοχή στην στρεπτομυκίνη.....	89
1.11 Γενεολογίες των <i>M. tuberculosis</i> Complex	92
1.11.1 Εξέλιξη των <i>M. tuberculosis</i> Complex	92
1.11.2 Παγκόσμια διασπορά των γενεολογιών <i>M. tuberculosis</i>	94
1.11.3 Παθογονικότητα-μολυσματικότητα και ποικιλότητα των MTBC	96
1.12 Μοριακή επιδημιολογία της φυματίωσης.....	98
1.12.1 Ανάλυση IS6110-RFLP	101
1.12.2 Spoligotyping	102
1.12.3 MIRU-VNTR Τυποποίηση	103
1.12.4 Τυποποίηση πολυδιαχωριστικών περιοχών προσδιορισμού αλληλουχίας Multispacer Sequence Typing (MST)	104
ΣΚΟΠΟΣ	106
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	108

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	109
2.1 Βακτηριακά στελέχη.....	109
2.2 Επεξεργασία κλινικών δειγμάτων.....	109
2.3 Χρώση Ziehl-Neelsen	111
2.4 Καλλιέργεια και απομόνωση των μυκοβακτηριδίων.....	112
2.4.1 Καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό, MGIT 960	112
2.4.2 Καλλιέργεια Löwenstein-Jensen.....	114
2.5 Ανίχνευση και ταυτοποίηση των στελεχών <i>M. tuberculosis</i> Complex	115
2.5.1 Εκχύλιση DNA είτε από το κλινικό δείγμα είτε από θετική καλλιέργεια	115
2.5.2. Αρχές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	117
2.5.3. Ταυτοποίηση του <i>M. tuberculosis</i> Complex με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	121
2.5.4. Διαχωρισμός των στελεχών του <i>M. tuberculosis</i> Complex σε διάφορα είδη με πολλαπλή PCR και ανάστροφο υβριδισμό.....	126
2.6 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του <i>M. tuberculosis</i> Complex	132
2.6.1 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του <i>M. tuberculosis</i> Complex σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960	133
2.6.2 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του <i>M. tuberculosis</i> Complex με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H10.....	136
2.6.3 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του <i>M. tuberculosis</i> Complex με ταινίες διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test) σε στερεό θρεπτικό υλικό.....	139

2.7. Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντιφυματικά	141
2.7.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων με πολλαπλή PCR και ανάστροφο υβριδισμό	141
2.7.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα 1ης και 2ης γραμμής.....	145
2.7.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην ισονιαζίδη.....	146
2.7.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην ριφαμπικίνη	148
2.7.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην αιθαμβουτόλη	148
2.7.6 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην πυραζιναμίδη	149
2.7.7 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην στρεπτομυκίνη.....	149
2.7.8. Ηλεκτροφόρηση	150
2.7.9. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	152
2.7.10. Αλληλούχηση DNA (DNA sequencing)	153
2.8. Τυποποίηση των στελεχών <i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i>	156
2.8.1. Τυποποίηση των στελεχών <i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i> με τη μέθοδο Multispacer Sequencing Typing (MST).....	156
2.8.2. Τυποποίηση των στελεχών <i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canettii</i> με τη μέθοδο MIRU-VNTR...	158
2.8.3. Τυποποίηση στελεχών Beijing με τη μέθοδο RFLP-PCR.....	162
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	165
3.1 Ταυτοποίηση στελεχών <i>M. tuberculosis</i> Complex σε επίπεδο γένους και είδους	165
3.2 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιφυματικά 1ης και 2ης γραμμής στελεχών <i>M. tuberculosis</i> Complex.....	168

3.2.1 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στελεχών <i>M. tuberculosis</i> Complex.....	168
3.2.2 Σύγκριση των τριών μεθόδων έλεγχου ευαισθησίας των 54 στελεχών	170
3.2.3 Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν τα 54 στελέχη που μελετήθηκαν.....	173
3.3 Μοριακή τυποποίηση στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	175
3.3.1 Αποτελέσματα τυποποίησης των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i> βάσει της μεθόδου MST.....	175
3.3.2 Αποτελέσματα τυποποίησης των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i> βάσει της μεθόδου MIRU-VNTR	177
3.3.3 Σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων τυποποίησης MST και MIRU-VNTR	178
3.3.4 Αποτελέσματα τυποποίησης στελεχών Beijing με RFLP-PCR	180
3.4 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα 1ης και 2ης γραμμής αντιφυματικά	181
3.4.1 Αποτελέσματα της εμπορικής δοκιμασίας MTBDRplus στην ανίχνευση της αντοχής σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη	181
3.4.2 Ευρύς μοριακός έλεγχος των γονιδίων αντοχής των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	182
3.4.2α Αντοχή σε ισονιαζίδη.....	182
3.4.2α1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>katG</i>	182
3.4.2α2 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>inhA</i> και του προαγωγέα του.....	183
3.4.2α3 Αποτελέσματα ενίσχυσης του <i>mabA</i> γονιδίου.....	184
3.4.2α4 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>ahpC</i> και του προαγωγέα αυτού	184

3.4.2α5 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>nat</i>	185
3.4.2α6 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>mshA</i>	185
3.4.2α7 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>ndh</i>	185
3.4.2α8 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>accD6</i>	186
3.4.2α9 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>srmR homolog</i>	186
3.4.2α10 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>Rv1592c</i>	186
3.4.2α11 Αποτελέσματα ενίσχυσης γονιδίων <i>efpA, kasA, fbpC, fabD, Rv1772 και fadE24</i> ...	187
3.4.2β Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής κοινών στη ισονιαζίδη και στην αιθαμβουτόλη των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	187
3.4.2β1 Αποτελέσματα ενίσχυσης των γονιδίου του οπερονίου <i>iniBAC</i>	187
3.4.2β2 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>Rv0340</i>	188
3.4.γ Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη αιθαμβουτόλη των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	189
3.4.γ1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>embB</i>	189
3.4.δ Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη ριφαμπικίνη των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	189
3.4.ε Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη πυραζιναμίδη των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	190
3.4.ε1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>phcA</i>	190
3.4.ε2 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>rpsA</i>	190
3.4.ε3 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>panD</i>	191

3.4.στ Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη στρεπτομυκίνη των στελεχών <i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	191
3.4.στ1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>rrs</i>	191
3.4.στ2 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>rpsL</i>	191
3.4.στ3 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου <i>gidB</i>	192
3.5 Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στα 1ης και 2ης γραμμής αντιφυματικά των στελεχών <i>M. bovis</i>	196
3.6.1 Αποτελέσματα πολυμορφισμών σε σχέση με τους κλωνικούς τύπους STs.....	198
3.6.2 Αποτελέσματα πολυμορφισμών σε σχέση με τις οικογένειες MIRU-VNTR.....	199
3.6.3 Αποτελέσματα πολυμορφισμών των στελεχών <i>M. bovis</i>	200
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	201
Συμπεράσματα.....	224
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	226

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η φυματίωση (tuberculosis, TB) αποτελεί μέρος της ανθρώπινης ιστορίας εδώ και χιλιάδες χρόνια. Πρόκειται για μια αρχαία ασθένεια που παρουσιάζει μέχρι σήμερα τεράστια πρόκληση για την παγκόσμια υγεία. Το βάρος της νόσου και του θανάτου που προκαλείται από τη φυματίωση την καθιστά μια από τις πιο σημαντικές και επικίνδυνες ασθένειες στην ιστορία του ανθρώπινου είδους. Πιθανολογείται ότι είναι η νόσος με την μεγαλύτερη απώλεια σε ανθρώπινες ζωές (Dubos and Dubos, 1953). Έχει κινήσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων από τα αρχαία χρόνια μέχρι σήμερα. Το πρόβλημα είναι ότι παρόλη τη μακρόχρονη πορεία ερευνών ακόμη και στις μέρες μας συνεχίζει να αποτελεί αιτία αρκετών θανάτων σε παγκόσμιο επίπεδο. Ήταν υπεύθυνη για επιδημίες στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική κατά τη διάρκεια του 18ου και 19ου αιώνα, και έχει πάρει και πάλι παγκόσμιες διαστάσεις επιδημίας (Daniel, 2006, Herzog, 1998).

Η φυματίωση προκαλείται από το *Mycobacterium tuberculosis* Complex (*M. canetti*, *M. bovis*, *M. africanum*). Η παρουσία του *M. tuberculosis* παρατηρήθηκε στον ανθρώπινο πληθυσμό από την αρχή της καταγεγραμμένης ιστορίας (Gutierrez *et al*, 2005). Η μελέτη του γενετικού υλικού σε αρχαίους ιστούς με τη χρήση σύγχρονων μοριακών τεχνικών απέδειξε ότι η φυματίωση είναι μια αρχαία ασθένεια και ότι ήταν ευρέως διαδεδομένη στην Αίγυπτο, την αρχαία Ελλάδα και τη Ρώμη (Zink *et al*, 2003, Donoghue *et al*, 2004). Γραπτές περιγραφές της φυματίωσης είναι καλά τεκμηριωμένες στην ελληνική βιβλιογραφία από την εποχή του Ιπποκράτη (460 – 370 π.Χ.) (Daniel, 2006). Ο Ιπποκράτης χαρακτήρισε τη φυματίωση ως μια νόσο με ευρύ φάσμα που περιελάμβανε βήχα με αίμα, πυρετό μέχρι και θάνατο (Καμάρα, 2006) και πρότεινε θεραπεία με φρέσκο αέρα, γάλα και ταξίδια στη θάλασσα (Daniel, 2006). Εισήγαγε τον όρο «φθίση», ο οποίος χρησιμοποιείτο διεθνώς μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα (Daniel, 2006).

Στη Μεσαιωνική εποχή στην Αγγλία η φυματίωση και κυρίως η φυματιώδη λεμφαδενίτιδα είχε την ονομασία «King's evill» (κακό του βασιλιά) και πίστευαν ότι θεραπευόταν με το άγγιγμα του Βασιλιά, γνωστό ως «King's touch» (Daniel, 2006, Herzog, 1998).

Την εποχή της Αναγέννησης στην Ευρώπη (Daniel, 2006) εμφανίστηκαν διάφορες θεωρίες σχετικά με την αιτιολογία και τη μετάδοση της φυματίωσης. Ορισμένοι ερευνητές

πίστευαν ότι η φυματίωση είναι κληρονομική και άλλοι ότι είναι μολυσματική (Herzog, 1998). Πιο ακριβείς παθολογικές και ανατομικές περιγραφές της νόσου άρχισαν να εμφανίζονται τον 17ο αιώνα (Daniel, 2006). Ο Sylvius Delaboe το 1680 ονόμασε «φυμάτια» (*tubercula*) την ανατομική βλάβη της πνευμονικής φυματίωσης, δηλαδή τα πνευμονικά οζίδια (Al-Humadi *et al*, 2017, Barberis *et al*, 2017) και το 1722 ο Benjamin Martin παρουσίασε αποδεικτικά στοιχεία για την μολυσματική φύση της φυματίωσης (Daniel, 2006, Barberis *et al*, 2017). Στην Ευρώπη τον 19ο αιώνα η νόσος χαρακτηριζόταν ως «Λευκή Πανώλη» (White Plague) λόγω της νοσηρότητας και της χαρακτηριστικής εικόνας των ασθενών (Frith, 2014).

Η χαρακτηριστικά αλλοίωση των πνευμόνων άλλα και άλλων οργάνων του σώματος, περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Rene Theophile Hyacinthe Laënnec το 1819, εφευρέτη του στηθοσκοπίου (Roguin, 2006). Η νόσος μετονομάστηκε σε φυματίωση το 1839 από τον Johann Lukas Schönlein, ο οποίος αναγνώρισε το φυμάτιο ως θεμελιώδη ανατομική βλάβη (Ryan, 1992). Η πρώτη θεραπεία με μικρή αποτελεσματικότητα αποτέλεσαν τα σανατόρια, τα οποία εφαρμόστηκαν μέχρι τον 20ο αιώνα. Το 1854 ο Hermann Brehmer έθεσε σε εφαρμογή το πρώτο σανατόριο στο Gorbisdorf της Γερμανίας, όπου οι ασθενείς μεταφερόταν σε περιοχές με υψηλό υψόμετρο, καθαρό αέρα, φως ήλιου και ξηρό κλίμα (Daniel, 2006, Barberis *et al*, 2017). Η οριστική απόδειξη της μεταδοτικότητας της φυματίωσης δόθηκε από τον Jean-Antoine Villemin το 1868 (Herzog, 1998, Palomino *et al*, 2007). Το 1882, ο Γερμανός επιστήμονας Robert Koch ήταν ο πρώτος που απομόνωσε το βάκιλο της φυματίωσης και τον παρουσίασε ως αιτιολογικό παράγοντα της φυματίωσης. Κατάφερε να ταυτοποιήσει το βάκιλο της φυματίωσης σε ανθρώπινες βλάβες άλλα και σε ζώων, να τον καλλιεργήσει εκτός οργανισμού και να τον οπτικοποιήσει ως ράβδο στο μικροσκόπιο (Ryan, 1992, Sakula, 2005). Παρουσίασε οριστικά στοιχεία ότι η φυματίωση ήταν μια μεταδοτική ασθένεια και όχι κληρονομική (Kaufmann *and* Schaible, 2005), αλλάζοντας και τη θεραπευτική προσέγγιση. Ένα χρόνο αργότερα, ο βάκιλος ονομάστηκε *M. tuberculosis*. Επιπλέον, το 1882 επινοήθηκε από τους Franz Ziehl και Friedrich Neelsen η ειδική χρώση για τα οξεάντοχα μυκοβακτηρίδια που ονομάστηκε Ziehl-Neelsen. Η ανακάλυψη των ακτινών X το 1896 από τον Wilhelm Conrad Röntgen ήταν ιδιαίτερα σημαντική για τη διάγνωση της φυματίωσης. Αργότερα, το 1921

σημειώθηκε πρόοδος στην πρόληψη της φυματίωσης με την ανακάλυψη και την παρασκευή του εμβολίου BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) από τους Albert Calmette and Camille Guerin στο Ινστιτούτο Pasteur της Lille. Επρόκειτο για ένα εμβόλιο από ζωντανούς εξασθετισμένους βακίλους *bovis*. Ο Αμερικανός Selman Abraham Waksman με την ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης (1944) είναι ο πρωτοπόρος μιας πραγματικά αποτελεσματικής φαρμακευτικής θεραπείας. Ωστόσο πολύ σύντομα παρουσιάστηκαν τα πρώτα στελέχη με αντοχή στην στρεπτομυκίνη. Η μεγαλύτερη και σημαντικότερη ανακάλυψη ήταν αυτή της ισονιαζίδης (1951), ακολουθώντας με χρονολογική η πυραζιναμίδα (1952), η ριφαμπικίνη (1957) και η αιθαμβουτόλη (1962) (Keshavjee and Farmer, 2012).

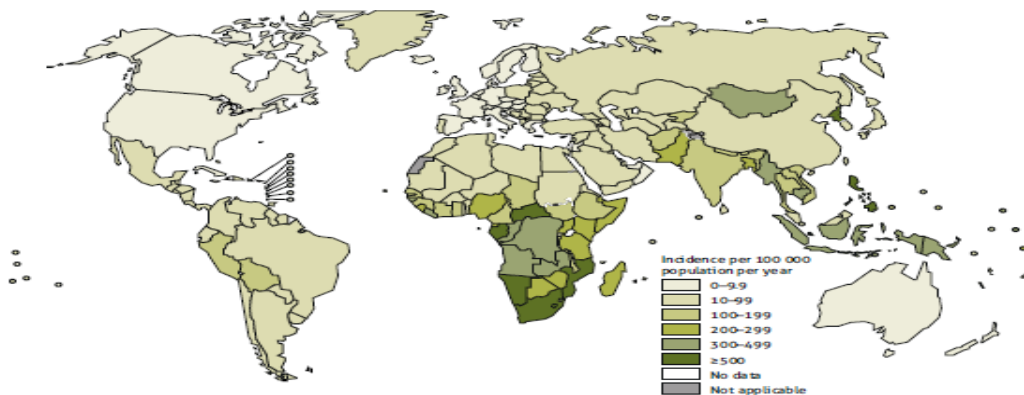
Η χρήση αυτών των αντιφυματικών φαρμάκων από το 1950 και μετά οδήγησαν σε μείωση του προβλήματος της φυματίωσης στη χώρα μας αλλά και στην Ευρώπη. Η κατάσταση αυτή όμως ανετράπη το 1980 σε παγκόσμιο επίπεδο και μέχρι σήμερα παρατηρείται αναζωπύρωση της νόσου. Με την εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών στα αντιφυματικά φάρμακα, νέες κατηγορίες αντιβιοτικών, όπως φθοριοκινολόνες έχουν χρησιμοποιηθεί. Η αύξηση του ποσοστού αντοχής στα διάφορα αντιφυματικά και κυρίως η πολυανθεκτικών στελεχών απαιτεί μια συνεχή αναζήτηση νέων υποψήφιων φαρμάκων (Lalloo and Ambaram, 2010).

1.2 Επιδημιολογία

Περισσότεροι από 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι (περίπου το 1/3 του πληθυσμού της γης) υπολογίζεται ότι έχουν μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Κάθε λεπτό σημειώνεται ένα νέο περιστατικό λοίμωξης παγκοσμίως. Το έτος 1995, μετά την έναρξη της Άμεσης Παρακολούθησης Βραχείας Διάρκειας Θεραπεία (DOTS, Directly Observed Treatment Short-course), ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) δημοσίευσε την πρώτη παγκόσμια αναφορά για τη φυματίωση όπου κοινοποίησε περίπου 3.4 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις (Raviglione *et al*, 1997).

Στην πιο πρόσφατη έκθεση για την φυματίωση του 2019, ο Π.Ο.Υ. αναφέρει την κατάσταση της φυματίωσης σε περισσότερες από 200 χώρες, καλύπτοντας τόσο τις αναπτυσσόμενες και όσο και τις ανεπτυγμένες χώρες (WHO, 2019).

Σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του Π.Ο.Υ. (WHO, 2019) και του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC, 2020), το έτος 2019 κατεγράφησαν 10,0 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις φυματίωσης και 1,2 εκατομμύρια θάνατοι σε ασθενείς χωρίς AIDS και 251.000 θάνατοι σε φορείς του ιού HIV (Εικόνα 1.1). Το 85% των θανάτων προερχόταν από τις αναπτυσσόμενες χώρες. Από τα νέα κρούσματα, το 89% ήταν ενήλικες, το 57% ήταν άνδρες (≥ 15 ετών) και το 8,6% ήταν ασθενείς με AIDS. Εκτιμάται ότι 1 εκατομμύριο παιδιά νόσησαν (11%) και 200.000 παιδιά πέθαναν από TB (συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με AIDS). Η συχνότητα εμφάνισης ήταν πολύ υψηλότερη στους άνδρες από τις γυναίκες.



Εικόνα 1.1: Εκτιμώμενα ποσοστά επίπτωσης της φυματίωσης, ανά χώρα του 2018 (WHO, 2019)

Οι εκτιμήσεις της επίπτωσης και της θνησιμότητας διέφεραν από χώρα. Γεωγραφικά, το βάρος της φυματίωσης ήταν υψηλότερο σε πυκνοκατοικημένες ηπείρους. Το μεγαλύτερο ποσοστό των νέων νοσούντων κατοικούσαν στην Ασία και στην Αφρική. Συγκεκριμένα, το 67% προερχόταν από Κίνα, Ινδία, Ινδονησία, Φιλιππίνες, Πακιστάν, Νιγηρία, Μπαγκλαντές και Νότια Αφρική. Αιτίες των αυξημένων ποσοστών στις χώρες αυτές ήταν οι κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες (συνθήκες διαβίωσης, κακή διατροφή, έλλειψη προληπτικού ελέγχου, ανεπάρκεια φαρμάκων αντιφυματικών), συνοσηρότητα με άλλες ασθένειες (σακχαρώδης διαβήτης, AIDS) και άλλοι παράγοντες όπως το κάπνισμα

και το αλκοόλ (Davies *et al.*, 2006, Restrepo. 2007). Στις χώρες με χαμηλό επιπολασμό της νόσου τα μισά δείγματα απομονώθηκαν από μετανάστες προερχόμενοι από περιοχές με υψηλό επιπολασμό (Scotto *et al.*, 2017, Odone *et al.*, 2015). Η επιδημιολογία των χωρών με υψηλό εισόδημα άλλαξε από την εισροή των μεταναστών (Zammarchi *et al.*, 2014, Hollo *et al.*, 2016, Sandgren *et al.*, 2014).

Η ανθεκτική φυματίωση (drug-resistant tuberculosis) συνεχίζει να αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία. Οι περιπτώσεις πολυανθεκτικής/μονο-αντοχής στη ριφαμπικίνη φυματίωσης (MDR/RR-TB) που κατεγράφησαν ήταν περίπου 490.000 και το ήμισυ (50%) αυτών ήταν σε Ινδία, Κίνα και Ρωσία.

Το 6,2% των καταγεγραμμένων περιπτώσεων πολυανθεκτικής φυματίωσης το 2019 παρουσίαζαν εκτεταμένη αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα (XDR-TB), μειωμένη συγκριτικά με το προηγούμενο έτος (8,5% το 2018).

Ο γενικός στόχος του Π.Ο.Υ. είναι να τερματιστεί η παγκόσμια επιδημία της φυματίωσης. Για να αντιμετωπιστούν οι ανησυχίες του αυξανόμενου αριθμού των περιστατικών φυματίωσης και της αντοχής των αντιφυματικών φαρμάκων, ο Π.Ο.Υ. έχει αναπτύξει τη «Στρατηγική Διακοπής της Φυματίωσης» (Stop TB Strategy) που ξεκίνησε το 2006, με όραμα «Ένας κόσμος ελεύθερος από φυματίωση». Τον Μάιο του 2014, η Παγκόσμια Συνέλευση Υγείας παρουσίασε επίσημα τη στρατηγική του Π.Ο.Υ. για τη διακοπή της φυματίωσης και τους στόχους Αειφόρου Ανάπτυξης (Sustainable Development Goals, SDGs) των Ηνωμένων Εθνών. Ο σκοπός της στρατηγικής είναι η εξάλειψη της φυματίωσης ως δημόσια απειλή για την υγεία μέχρι το 2035.

Σύμφωνα με το ECDC (ECDC, 2020) στην Ευρώπη κατεγράφησαν περίπου 259000 περιπτώσεις και 23000 θάνατοι σε ασθενείς χωρίς AIDS. Τα μεγαλύτερα ποσοστά κατεγράφησαν στους ενήλικες, 63% άντρες, ενώ 4% σε παιδιά κάτω των 15 ετών. Περίπου 77000 ασθενείς διαγνώστηκαν με MDR-TB και 19.2% των ασθενών με MDR-TB είχαν XDR-TB, παρουσιάζοντας μικρή αύξηση της τάξης του 1,2 % από το 2017.

Τα τελευταία δημοσιευμένα επιδημιολογικά δεδομένα από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. για την Ελλάδα είναι για το χρονικό διάστημα 2004-2015. Σύμφωνα με αυτό τα νέα δηλωθέντα κατά μέσο όρο κρούσματα ετησίως είναι 600 εκ των οποίων το 61% αφορά Έλληνες (κυρίως >65ετών) και το 38% άτομα αλλοδαπής εθνικότητας (15-44ετών). Τα παιδιά με

φυματίωση στην Ελλάδα εκπροσωπούν περίπου το 7% της συνολικής επίπτωσης της φυματίωσης και θεωρείται πολύ χαμηλό ποσοστό. Αυτή η επίπτωση τοποθετεί τη χώρα μας μεταξύ των χωρών με χαμηλή διασπορά της νόσου. Από το 2013 παρατηρείται μια πτωτική πορεία των κρουσμάτων, ωστόσο με την μεγάλη εισροή μεταναστών από το 2016 και έπειτα, αναμένεται αύξηση των κρουσμάτων φυματίωσης. Το 2015 τα περισσότερα κρούσματα αφορούσαν πνευμονική φυματίωση, το 4,3% των ασθενών εμφάνιζε πολυανθεκτική φυματίωση και ένας εξαιρετικά ανθεκτική φυματίωση. Σύμφωνα με το ECDC για το έτος 2018 (ECDC, 2020), στην Ελλάδα υπήρξαν 432 περιστατικά φυματίωσης, εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό προερχόταν από ενήλικες άντρες και το 50% ήταν αλλοδαποί. Το 83,6% των ασθενών εκδήλωσαν πνευμονική φυματίωση, από τους οποίους το 3,7% έχει MDR-TB. Κατά την τελευταία όμως τριετία, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των περιστατικών φυματίωσης σε πληθυσμιακές ομάδες αυξημένου κινδύνου, όπως κρατούμενοι, Χρήστες Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών, άτομα με HIV λοίμωξη κ.α. Το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. στην έκθεση του επισήμανε ότι υπήρχε σοβαρό πρόβλημα υποδήλωσης των κρουσμάτων στην Ελλάδα, με αποτέλεσμα τη μη σωστή αποτύπωση της επιδημιολογικής εικόνας της νόσου στη χώρα (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2015). Η υποδήλωση των περιστατικών της φυματίωσης συνεχίζει να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη χώρα μέχρι και σήμερα.

1.3 Ταξινόμηση

Η ονομασία *Mycobacterium* εισήχθη το 1896 από τους Lehmann και Newmann. Οι τελευταίοι χρησιμοποίησαν τον όρο αυτό για να χαρακτηρίσουν το γένος στο οποίο εκχώρησαν το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*) και της λέπρας (*Mycobacterium leprae*). Πρόκειται για σύνθετη λέξη που προήλθε από τις ελληνικές λέξεις μύκητες (myco-) και βακτήριο (bakterion). Η ονομασία δεν συνεπάγει ότι το μυκοβακτηρίδιο είναι μύκητας, άλλα περιγράφει τον τρόπο που ο βάκιλος της φυματίωσης αναπτύσσεται στην επιφάνεια υγρών θρεπτικών μέσων δημιουργώντας επιφανειακές βιομεμβράνες, όπως η μούχλα (Goodfellow and Magee, 1998).

Το *Mycobacterium* είναι το μόνο γένος της οικογένειας *Mycobacteriaceae*, όπου για πολλά χρόνια κατατάσσονταν ως εξής: υποτάξη *Corynebacterineae*, τάξη *Actinomycetales*,

φύλο *Actinobacteria*, βασίλειο *Bacteria* και εικάζεται ότι προήλθε περισσότερο από 150 εκατομμύρια χρόνια πριν (Daniel 2006, Gutierrez *et al*, 2005, Jagielski *et al*, 2016). Οι Gao and Gupta το 2012 ανέλυσαν βάσει μοριακών τεχνικών το φύλο *Actinobacteria*, αλλάζοντας την κατάταξη του γένους των μυκοβακτηριδίων. Σήμερα, τα μυκοβακτηρίδια ανήκουν στο γένος *Mycobacterium*, στην οικογένεια *Mycobacteriaceae*, στη τάξη *Corynebacteriales*, στο φύλο *Actinobacteria* και στο βασίλειο *Bacteria* (Gao and Gupta, 2012).

Παρατηρήθηκε ότι τα μυκοβακτηρίδια φυλογενετικά ανήκουν στα Gram-θετικά βακτήρια εν τούτοις, λόγω του εξαιρετικά υδρόφοβου κυτταρικού τους τοιχώματος, διαφέρουν αμφοτέρω των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, διότι είναι ασθενώς χρωματισμένα με χρώση κατά Gram. Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα που βασίστηκε στη μελέτη διατηρημένων γονιδίων αποδείχτηκε ότι τα Gram-θετικά βακτήρια, όπως ο *Bacillus*, εξελικτικά έχουν πλησιέστερο πρόγονο τα μυκοβακτηρίδια, από ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια (Fu and Fu-Liu, 2002, Hett and Rubin, 2008).

Το γένος *Mycobacterium* αποτελείται από 188 είδη, σύμφωνα με την τελευταία λίστα βακτηριακών ειδών (Parte , 2014, Radhey *et al*, 2018) από τα οποία ορισμένα είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Επιπλέον, υπάρχουν μυκοβακτηρίδια που μολύνουν μόνο ζώα, ενώ κάποια έχουν ξενιστή τον άνθρωπο και τα ζώα. Ωστόσο, τα περισσότερα έχουν απομονωθεί από το φυσικό περιβάλλον όπως το νερό και το έδαφος, και ελάχιστα προκαλούν νόσο (Hartmans *et al*, 2006; Brzostek *et al*, 2009; Falkinham, 2009; Tortoli, 2012, Azé *et al*, 2015). Για την ταξινόμηση των μυκοβακτηρίων σε διαφορετικά είδη έχουν χρησιμοποιηθεί φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές δοκιμές. Πρόσφατα γονοτυπικά χαρακτηριστικά έχουν εισαχθεί ως εργαλείο για μυκοβακτηριδιακή ταυτοποίηση και ταξινόμηση.

Με βάση την παθογονικότητα στον άνθρωπο και τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά τα μυκοβακτηρίδια μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες. Στα παθογόνα μυκοβακτηρίδια, που είναι ισχυρά παθογόνα για τον άνθρωπο ή/και τα ζώα. Τα ευκαιριακά ή δυνητικά ανήκουν τα μυκοβακτηρίδια που συνήθως συμβιώνουν στον άνθρωπο, αλλά μπορούν να γίνουν παθογόνα υπό ορισμένες συνθήκες (Falkinham *et al*, 2002). Τέλος, τα σπάνια ή μη παθογόνα, τα οποία σπάνια θα προκαλέσουν λοιμώξεις και

είναι περιβαλλοντικά, εμφανίζονται ευρέως σε φυσικά οικοσυστήματα όπως τα έδαφος και τα επιφανειακά ύδατα. Μεταξύ των παθογόνων ειδών, δυο είναι υποχρεωτικά παθογόνα και τα πιο επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία, *M. tuberculosis* και *M. Leprae* (Hett and Rubin, 2008, Brosch *et al*, 2002, Forbes, 2017, Ventura *et al*, 2007)

Στις μέρες μας, τα διάφορα είδη που αποτελούν το γένος *Mycobacterium* έχουν ομαδοποιηθεί στις τρεις μεγάλες κατηγορίες, *M. tuberculosis Complex* (MTBC), άτυπα μυκοβακτηρίδια (NTM, Nontuberculous Mycobacteria) και *M. leprae*.

Το *M. tuberculosis Complex* (MTBC), απαρτίζεται από μέλη προκαλούν φυματίωση στους ανθρώπους με πιο γνωστό και διαδομένο το είδος *Mycobacterium tuberculosis*. Τα υπόλοιπα μέλη είναι τα *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium bovis*, *M bovis BCG*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *M ycobacterium orygis*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*. Όλα αυτά τα είδη έχουν παρόμοια γενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Πρόκειται για μυκοβακτηρίδια αργής ανάπτυξης με χρόνο διπλασιασμού περίπου 24 ώρες (Brosch *et al*, 2001). Παρουσιάζουν υψηλή γενετική ομολογία, χωρίς σημαντική διακύμανση μεταξύ των αλληλουχιών τους (~ 0,01 έως 0,03%), που δηλώνει ότι εξελίχθηκαν μονοκλωνικά από έναν κοινό πρόγονο, αν και υπάρχουν διαφορές στους φαινοτύπους (Homolka *et al.*, 2008).

Κάποια από τα είδη του MTBC έχουν απομονωθεί μόνο από ανθρώπους ή από ζώα, ενώ μερικά και από τους δυο ξενιστές. Το *M. tuberculosis* είναι η κύρια αιτία της φυματίωσης, το οποίο είναι ιδιαίτερα παθογόνο για τους ανθρώπους και για τα ζώα. Οι άνθρωποι θεωρούνται ως κύριες δεξαμενές (reservoir) για το *M. tuberculosis*. Η μόλυνση γίνεται από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ωστόσο, έχει ανιχνευθεί στα ψάρια, τα ερπετά, τα πτηνά, τα θηλαστικά και σε θαλάσσια ζώα.

Το *M. canettii* είναι το προγονικό είδος από το οποίο προήλθε το *M. tuberculosis* (Fabre *et al.*, 2004, Gutierrez *et al.*, 2005, Supply *et al.*, 2013). Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1969 από το Georges Canettii από ένα Γάλλο αγρότη (Miltgen *et al.*, 2008). Έχει απομονωθεί κυρίως από ασθενείς που ζουν στην Αφρική και μπορεί να προκαλέσει φυματίωση μόνο στους ανθρώπους (Van Soolingen *et al.*, 1997). Η κύρια δεξαμενή του *M. canettii* είναι άγνωστη, οι ασθενείς παρουσιάζουν πνευμονικά κλινικά χαρακτηριστικά και τα παιδιά μπορεί να παρουσιάσουν λεμφαδενίτιδα (Talip *et al.*, 2013). Το *M. africanum*

είναι κυρίως διαδεδομένο στην Δυτική Αφρική και μολύνει μόνο ανθρώπους (de Jong *et al.*, 2010).

Το *Mycobacterium bovis* έχει αποδειχθεί ότι έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών και είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της πλειοψηφίας των κρουσμάτων φυματίωσης στα βοοειδή. Ωστόσο, έχει συσχετιστεί με την ασθένεια σε πολλά κατοικίδια και άγρια ζώα, καθώς και σε ανθρώπους (Cosivi *et al.*, 1998, Moda *et al.*, 1996, Gortazar *et al.*, 2005). Το είδος αυτό έχει τεκμηριωθεί σε όλο το κόσμο με παρόμοιο αντίκτυπο όσον αφορά τους ασθενείς (Moda *et al.*, 1996). Ο κύριος τρόπος μετάδοσης στους ανθρώπους πιστεύεται ότι είναι κατανάλωση μολυσμένων μη παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Moda *et al.*, 1996). Πρόσθετοι οδοί μετάδοσης περιλαμβάνουν η στενή επαφή με μολυσμένα ζώα ή η σφαγή τους. Μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο μπορεί να συμβεί, αν και παραμένει σπάνιο (Evans *et al.*, 2007). Το εμβόλιο Bacille Calmette-Guérin (BCG) είναι ένα ζωντανό εξασθενημένο στέλεχος του *Mycobacterium bovis* που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της φυματίωσης που προκαλείται από το *M. tuberculosis* (Cha *et al.*, 2014), *M bovis* BCG.

Δύο από τα είδη του MTBC έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα μόνο από ζώα με φυματίωση, όπως το *M. suricattae* στους σουρικάτες (meerkat) της Νότιας Αφρικής (Dippenaar *et al.*, 2015), το *M.mungi* στα ραβδωτά μαγκούστα (Mungos mungo), σαρκοφάγα θηλαστικά που ζουν στην ανατολική και κεντρική Αφρική (Alexander *et al.*, 2018). Τα υπόλοιπα είδη έχει βρεθεί ότι μολύνουν ανθρώπους και ζώα, άλλα φυσική δεξαμενή αποτελούν τα ζώα. Σε οικόσιτα και άγρια ζώα έχουν βρεθεί το *M. caprae* και σε περιορισμένο βαθμό, σε ανθρώπους σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (Prodinge *et al.*, 2018) και το *M. orygis* σε μικρό ποσοστό σε ανθρώπους στην Αφρική, τη Νότια Ασία και τη Νέα Ζηλανδία (van Ingen J *et al.*, 2012, Thapa *et al.*, 2015). Οι φώκιες, οι θαλάσσιοι ελέφαντες και άλλα πτερυγιόποδα αποτελούν τους φυσικούς ξενιστές για το *M. pinnipedii*. Ωστόσο, έχει μεταδοθεί και σε ανθρώπους που εργάζονταν σε θαλάσσιο ζωολογικό κήπο (Kiers *et al.*, 2008), σε καμήλα σε ζωολογικό κήπο (Moser *et al.*, 2008) και σε βοοειδή στη Νέα Ζηλανδία (Loeffler *et al.*, 2014). Το *M. microti* απομονώθηκε για πρώτη φορά σε αρουραίους (*Microtus agrestis*). Μολύνει οικόσιτα ζώα, γάτες, κουνέλια, τρωκτικά, μεγαλύτερα θηλαστικά (Jahans *et al.*, 2004, Gunn-Moore *et al.*, 1996, Kremer *et al.*, 1998, Oevermann *et al.*, 2004).και τον άνθρωπο (Panteix *et al.*, 2010, Geiss *et al.*, 2005). Το *M.*

microti είναι κατάλληλο για την παρασκευή εμβολίου, διότι στον ανθρώπινο οργανισμό εξασθενεί η λοιμογόνος δράση του έχοντας την ίδια προστατευτική δράση με το BCG. Παρόλα αυτά βρέθηκε ότι είχε περισσότερες τοπικές παρενέργειες σε σχέση με το BCG και για αυτό δεν χρησιμοποιήθηκε (Hart *et al.*, 1977).

1.4 Χαρακτηριστικά

Τα μυκοβακτήρια είναι οξεάντοχοι, αερόβιοι, ακίνητοι, χωρίς κάψα Gram-θετικοί βάκιλοι και με υψηλή περιεκτικότητα σε G+C (Belisle and Brennan, 1989, Biet, 2005, Pfyffer *et al.*, 2007). Όσον αφορά τη μορφολογία τους είναι λεπτά, ραβδόμορφα βακτηρίδια, ευθύγραμμα ή με μικρή κύρτωση, κυμαίνονται μεταξύ 0,2 με 0,6 μm (συνήθως 3-5 μm) σε πλάτος και 1 με 10 μm σε μήκος, και ενίοτε κάνουν διακλαδώσεις (Belisle and Brennan, 1989).

Συγκεκριμένα, το *M. tuberculosis*, διατάσσεται σε ζεύγη, παράλληλες σειρές ή σωρούς, όταν καλλιεργείται *in vitro* (Middlebrook, 1950, Danie, 2006, Gutierrez *et al.*, 2005). Μπορεί να αναπτυχθεί σε υγρά περιβάλλοντα, σχηματίζοντας συνήθως μάζες, λόγω του υψηλά υδρόφοβου περιβλήματός του και πολλαπλασιάζεται μέσα στα μακροφάγα.

Οι αποικίες του είναι μη χρωμογόνες και τραχείες (Eckstein *et al.*, 2000, Fregnan and Smith, 1962). Η μορφολογία των αποικιών έχει βρεθεί ότι μπορεί να οφείλεται κατά κύριο λόγο στα επίπεδα έκφρασης των γλυκοπεπτιδολιπιδίων (GPLs, glycopeptidolipids). Είναι υπεύθυνα για τις λείες αποικίες και συμβάλουν στο σχηματισμό βιοφίλμ, ενώ η απώλεια των GPLs συσχετίζεται με τραχείες αποικίες και διευκολύνει την επιβίωση σε μακροφάγα (Howard *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2013).

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι απαραίτητο για το *M. tuberculosis*, το οποίο μπορεί να το λάβει από την ατμόσφαιρα και από ανθρακικά άλατα ή όξινα ανθρακικά άλατα. Στο εργαστήριο, μια ατμόσφαιρα 5 έως 10% διοξειδίου του άνθρακα ευνοεί την ανάπτυξη καλλιέργειας, τουλάχιστον κατά τη διάρκεια του πρώιμου σταδίου της επώασης. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του είναι στους 37°C (Palomino *et al.*, 2007) και το ουδέτερο pH. Το εύρος pH ανάπτυξης κυμαίνεται 5,8-7 (Charman and Bernard 1962, Piddington *et al.*, 2000). Μια έρευνα έδειξε σχέση μεταξύ του pH και των διαφόρων

συγκεντρώσεων Mg^{2+} για την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων (Piddington *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα, σε καλλιέργεια με pH 6.25 απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση Mg^{2+} για την ανάπτυξη του *M. tuberculosis* (Piddington *et al.*, 2000).

Το *Mycobacterium tuberculosis* είναι υποχρεωτικά αερόβιο. Για το λόγο αυτό, βρίσκεται πάντα στους καλά αεριζόμενους άνω λοβούς των πνευμόνων σε ασθενείς με φυματίωση. Είναι ένα υποχρεωτικό ενδοκυτταρικό παθογόνο, συνήθως των μακροφάγων, και έχει χρόνο διπλασιασμού 15-20 ώρες, η οποία είναι εξαιρετικά αργή σε σύγκριση με άλλα βακτηρίδια με χρόνους διαίρεση σε λεπτά (π.χ. *Escherichia coli* μπορεί να διαιρέσει κάθε 20 λεπτά). Αν και μολύνει ιστούς με υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο, όπως οι πνεύμονες, αλλά μπορεί να μολύνει σχεδόν οποιοδήποτε όργανο του ξενιστή. Ο βάκιλος της φυματίωσης απαιτεί οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων σε αερόβια αναπνοή. Το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό στο τελευταίο στάδιο του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων. Επίσης, έχει την ικανότητα να μένει σε μια λανθάνουσα κατάσταση. Από την άλλη πλευρά, το *M. bovis* είναι μικροαεροφιλικό, δηλαδή μεγαλώνει κατά προτίμηση σε ελαττωμένη τάση οξυγόνου (Palomino *et al.*, 2007).

Όλα τα μυκοβακτηρίδια είναι μη σποριογόνα (North, 2004) εκτός από το *Mycobacterium bovis* για το οποίο σε πρόσφατες μελέτες αποδείχτηκε σπορογονία (Ghosh *et al.*, 2009). Επιπλέον, το *Mycobacterium tuberculosis* δεν παράγει τοξίνες (Ducati *et al.*, 2006).

Τα μυκοβακτηρίδια είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στην ξήρανση, τις αλκαλικές συνθήκες, τα χημικά απολυμαντικά, και σε θεραπευτικούς παράγοντες. Η αντοχή αυτή σχετίζεται με την ασυνήθιστη δομή και τη χαμηλή διαπερατότητα του μυκοβακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Pfyffer *et al.*, 2007, Lawn and Zumla, 2011). Υψηλή συγκέντρωση αλατούχου διαλύματος όπως αυτό που βρέθηκε σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν 5% χλωριούχο νάτριο, αναστέλλει την ανάπτυξη του *M. tuberculosis* (Palomino *et al.*, 2007, Conville *et al.*, 1988).

Καθώς το περιβάλλον αλλάζει, ο βάκιλος είναι σε θέση να φέρει στο προσκήνιο διαφορετικές φυσιολογικές οδούς, προκειμένου να επιβιώσει ακόμα και σε αντίξοες συνθήκες. Αυτή είναι μια ιδιαίτερα επινοητική στρατηγική, όχι μόνο για την παθογένεια αλλά και για την ανθεκτικότητα των ειδών (species persistence). Έχει αποδειχθεί ότι,

έπειτα από τη μόλυνση των ποντικών, ο μεταβολισμός του *M tuberculosis* μπορεί να μεταλλαχτεί από ένα αερόβιο, σχεδόν σε μικροαερόφιλο χρησιμοποιώντας τα λιπίδια. Αυτές οι παρατηρήσεις, οι οποίες έχουν αναφερθεί εδώ και πολλά χρόνια, υποστηρίχθηκαν τα τελευταία έτη από την πλήρη αλληλούχιση του γονιδιώματος του *M.tuberculosis* στις οποίες είχε εντοπισθεί ένας ασυνήθιστα υψηλός αριθμός γονιδίων που πιθανώς εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητα του παθογόνου να αναπτύσσεται ή να παραμένει σε ιστούς ξενιστή όπου τα λιπαρά οξέα μπορεί να είναι η κύρια πηγή άνθρακα (Neyrolles *et al.*, 2006).

1.5 Κυτταρικό τοίχωμα

Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων είναι μοναδική και ασυνήθης μεταξύ των προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Το κυτταρικό τοίχωμα των μυκοβακτηριδίων είναι μια σύνθετη δομή, πλούσια σε υψηλού μοριακού βάρους λιπίδια με χαμηλή διαπερατότητα (Brennan *and* Nikaido, 1995, Christensen *et al.*, 1999, Daffé *and* Draper 1998, Draper, 1998, Jarlier *et al.*, 1994), η οποία σχετίζεται με την παθογονικότητα (Zuber *et al.*, 2008, Reed *et al.* 2004, Rocha-Ramirez *et al.* 2008, Smith, 2003, Dubnau *et al.* 2000) και με την αργή ανάπτυξη τους (Ducati *et al.*, 2006). Επιπλέον, αυτές οι ιδιότητες συμβάλλουν στην ενδογενή αντοχή του μυκοβακτηριδίου στα περισσότερα αντιβιοτικά και την ικανότητά του να επιβιώσει σε σκληρά περιβάλλοντα (Draper, 1998.).

Παρόλο που θεωρούνται Gram-θετικοί βάκιλοι, το κυτταρικό τους τοίχωμα διαφέρει εντυπωσιακά από αυτό των Gram-θετικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα να μην βάφονται με χρώση Gram (Kremer *and* Besra, 2005, Metchock *and* Wallace, 1999). Η βασική αρχιτεκτονική του μυκοβακτηριακού κυτταρικού περιβλήματος διαφέρει από αυτές των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων.

Το περίβλημα του *Mycobacterium tuberculosis*, από το εσωτερικό προς τα εξωτερικό του κυττάρου, αποτελείται από μία κυτοπλασματική μεμβράνη, παρόμοια με άλλες πλασματικές μεμβράνες (Moussatova *et al.*, 2008), ένα κυτταρικό τοίχωμα αποτελούμενο από τρία ομοιοπολικά συνδεδεμένα μακρομόρια, την πεπτιδογλυκάνη (PG), την

αραβινογαλακτάνη (AG) και τα μυκολικά οξέα, και μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα λιπίδια. Το 25% αποτελείται από λιπαρά οξέα που βρίσκονται στην επιφάνεια του κύτταρου (Εικόνα 1.2).

Συγκεκριμένα, το κυτταρικό τοίχωμα εσωτερικά περιέχει ένα παχύ ομοιογενές στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Ένα διακλαδισμένο πολυμερές πολυσακχαρίτη, που ονομάζεται αραβινογαλακτάνη, συνδέεται με το στρώμα πεπτιδογλυκάνης με δεσμούς εστέρα. Η αραβινογαλακτάνη με τη σειρά είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μυκολικά οξέα (Brennan, 2003, Hong *and* Hopfinger, 2004, Kremer *and* Besra, 2005) (Εικόνα 1.2).

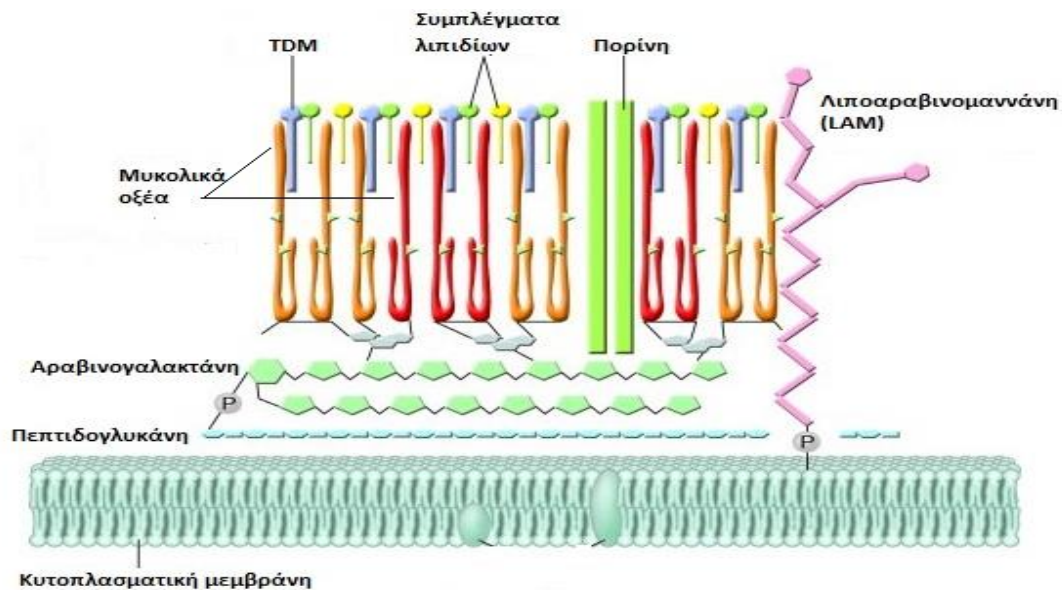
Τα μυκολικά οξέα είναι τα κύρια συστατικά του μυκοβακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος σχηματίζοντας μια σφικτά συσκευασμένη στρώση. Είναι μακρού μήκους διακλαδισμένα λιπαρά οξέα έως 56 άτομα άνθρακα σε ένα κλάδο και 20-24 άτομα άνθρακα στο άλλο και αντιπροσωπεύουν έως το 60% της ξηρό βάρους ολόκληρου κυττάρου (Brennan *and* Nikaido, 1995, Daffé *and* Draper 1998, Draper, 1998). Ορισμένοι τύποι μυκολικού οξέος υπάρχουν σε όλα τα μυκοβακτηρίδια, ενώ άλλα είναι ειδικά στα διάφορα είδη (Kremer *and* Besra, 2005, Minnikin *et al.*, 1982). Ο αριθμός των ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα του μυκολικού οξέος ποικίλλει στα διάφορα μυκοβακτηρίδια και κυμαίνεται από 60 έως 90 (Ratledge, 1976). Χαρακτηρισμός της σύνθεσης μυκολικού οξέος του κυτταρικού τοιχώματος με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριακών ειδών (Butler *et al.*, 1996).

Η εξωτερική επιφάνεια αυτού του στρώματος περιέχει πολλά συμπλέγματα λιπιδίων (π.χ. γλυκοπεπτιδολιπίδια, σουλφολιπίδια). Αυτά τα λιπαρά οξέα μπορούν να υπάρχουν είτε ελεύθερα είτε ενωμένα με υδατάνθρακες ως γλυκολιπίδια (μυκοσίδες). Το εξωτερικό στρώμα καλύπτεται από πορίνες (πρωτεΐνες) οι οποίες διαπερνούν το κυτταρικό τοίχωμα και έχουν παρόμοιες ιδιότητες με εκείνες που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη Gram αρνητικών βακτηριδίων, παρέχοντας ένα μονοπάτι για χαμηλού μοριακού βάρους υδρόφιλα θρεπτικά συστατικά (Niederweis, 2003).

Οι λιποπολυσακχαρίτες λιπομαννάνης (LM) και η λιποαραβινομαννάνη (LAM) συνδέονται μη ομοιοπολικά με το μυκοβακτηριακό περίβλημα (Εικόνα 1.2). Οι λιποαραβινομαννάνες (LAM) είναι μακριές διακλαδισμένες λιπογλυκάνες που αποτελούνται από τα σάκχαρα D-μαννάνης και D-αραβινάνης, προσαρτημένα σε

φωσφατιδυλ-μυο-ινοσιτόλη, η οποία αγκιστρώνει στην μεμβράνη του πλάσματος. Το άλλο άκρο είναι εκτεθειμένο στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος (Brennan *and* Nikaido, 1995, Daffé *and* Draper 1998, Draper, 1998).

Διαφορετικά μυκοβακτηριακά είδη έχουν διαφορετικά τροποποιημένα LAM (Brennan, 2003,, Kremer *and* Besra, 2005). Μία ακρωτηριασμένη μορφή του LAM χωρίς το μέρος αραβινάνης, που ονομάζεται λιπομαννάνη, είναι επίσης παρούσα στο κυτταρικό τοίχωμα (Besra *et al.*,1997). Ο μη ομοιοπολικός δεσμός των μυκολικών οξέων και του ελεύθερου συμπλέγματος λιπιδίων σχηματίζουν μια άτυπη εξωτερική μεμβράνη, σχηματίζοντας έτσι μία διπλή στιβάδα που δρα ως φραγμός διαπερατότητας έναντι στις υδρόφιλες ουσίες.



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος του *M. Tuberculosis*

Βάση ερευνών έχει δειχθεί επίσης η σημαντικότητα του «σχοινοειδής παράγοντας» ή παθογόνου παράγοντα (cord factor) για τα μυκοβακτηρίδια. Πρόκειται για την ένωση 6,6- διμυκολική τρεαλόζη (Trehalose 6,6'-dimycolate, TDM), η οποία αποτελείται από δύο μυκολικά οξέα που συνδέονται με τον δισακχαρίτη τρεαλόζη στο εξωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος (Εικόνα 1.2) (Noll *et al.*, 1956). Το *M. tuberculosis* παράγει ακατέργαστης υφής αποικίες σε στερεά θρεπτικά υλικά και κατά την μικροσκόπηση παρατηρούνται παράλληλες αλυσίδες σχηματίζοντας «σχοινοειδείς σχηματισμούς»

(Hunter *et al.*, 2006). Αυτοί βρίσκονται στα λοιμογόνα στελέχη και σχετίζεται με την παράλληλη διάταξη των μυκοβακτηρίων. Η διμυκολική τρεχαλόζη (Trehalose 6,6'-dimycolate, TDM) αποτελεί μόνο μία σχετικά μικρή ποσότητα των μυκολικών οξέων στο κυτταρικό τοίχωμα, αλλά απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες από μολυσματικό *M tuberculosis* (Hunter *et al.*, 2006). Μεγάλος αριθμός βιολογικών δραστηριοτήτων που σχετίζονται με την παθογένεια, την τοξικότητα και την προστασία έναντι της απόκρισης του ξενιστή έχουν αποδοθεί σε αυτό το μόριο. Ωστόσο, αυτό δεν φαίνεται να είναι απαραίτητο για την βακτηριακό πολλαπλασιασμό *in vitro* (Ryll *et al.*, 2001, Indrigo *et al.*, 2003). Έχει επίσης προταθεί ότι επάγει παραγωγή κυτοκινών, για να προκαλέσει το σχηματισμό κοκκιώματος (Guidry *et al.*, 2007).

Επιπλέον, σημαντικές λειτουργίες συνδέονται με το μυκοβακτηριακό περίβλημα, όπως ο καθορισμός του σχήματος του κυττάρου και η παροχή μηχανικής και οσμωτικής προστασίας. Μια άλλη σημαντική λειτουργία είναι η μεταφορά των μορίων, συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών ουσιών, ιόντων, των αντιβιοτικών και των τοξικών μεταβολιτών. Η ασυνήθιστα υψηλή υδροφοβία του είναι ένας αποτελεσματικός φραγμός για τα αντιβιοτικά, συμβάλλοντας έτσι στην ενδογενή αντοχή του στα αντιβιοτικά (π.χ. αντοχή του *M. tuberculosis* στα β-λακταμικά) και στην ικανότητα του να επιβιώνει σε δυσμενή περιβάλλον (Draper, 1998, Arias *et al.*, 2007). Σχετικά με το *M. tuberculosis*, όταν μολύνουν μακροφάγα, το κυτταρικό τοίχωμα είναι η αρχική επαφή μεταξύ του βακτηρίου και του ξενιστή, τα οποία αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις επιθέσεις ξενιστή. Επιπλέον, ορισμένα συμπλέγματα ελεύθερων λιπιδίων είναι γνωστό ότι είναι λοιμογόνοι παράγοντες, και άλλα συμβάλλουν στο να ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση από τον ξενιστή (Arias *et al.*, 2007). Αυτό το πλούσιο σε λιπίδια περίβλημα εξηγεί την τάση των μυκοβακτηριδίων να σχηματίζουν συσσωματώματα όταν καλλιεργούνται σε υγρό μέσο, καθώς και την ιδιότητα ως οξεάντοχα. Το χαρακτηριστικό κυτταρικό τοίχωμα των μυκοβακτηρίων διατηρεί τη χρωστική καρβόλης-φουξίνη μετά από μια πλύση με ένα αλκοολικό διάλυμα σε όξινο περιβάλλον (Ziehl-Neelsen χρώση), ενώ τα υπόλοιπα βακτήρια γρήγορα αποχρωματίζονται. Πρόσφατα προτάθηκε ότι αυτό είναι συνέπεια της πυκνότητας των μυκολικών οξέων (Kempself *et al.*, 1992, Brown *et al.*, 2010).

1.6 Μετάδοση-Πηγές μόλυνσης

Η φυματίωση μεταδίδεται κυρίως από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω της αναπνευστικής οδού με την εισπνοή μικροσταγινιδίων διαμέτρου 1 έως 5 μm τα οποία περιέχουν μυκοβακτηρίδια, *M.tuberculosis* και παραμένουν μολυσματικά για 8-10 ημέρες. Το κάθε σταγονίδιο μπορεί να περιέχει 1 έως 10 μολυσματικούς βακίλους (Lee, 2016). Πηγή μόλυνσης είναι οι ασθενείς με ενεργό λοίμωξη φυματίωσης του αναπνευστικού (Jones-López *et al.*, 2013, Ahmad *et al.*, 2011, Chandrasekaran *et al.*, 2017, Fennelly *et al.*, 2012), οι οποίοι εκπέμπουν μολυσματικά σωματίδια μέσω του βήχα, του φτερνίσματος και την ομιλία (Jones-López *et al.*, 2013). Η μεταδοτικότητα είναι μεγαλύτερη κατά το βήχα από ότι κατά την ομιλία (Long, 2015). Η μετάδοση απαιτεί την επίμονη επαφή και μέσα στα άτομα της ίδιας οικογένειας περιορίζεται στο 30% (Nicas *et al.*, 2005). Τα εισπνεόμενα σταγονίδια λόγω του μικρού μεγέθους φτάνουν μέχρι τις κυψελίδες, όπου εγκαθίστανται και προκαλούν τη νόσο (Jones-López *et al.*, 2013, Ahmad *et al.*, 2011).

Ένας σπάνιος τρόπος μετάδοσης είναι ο άμεσος ενοφθαλμισμός του δέρματος ή των βλεννογόνων (Ho *et al.*, 2006, Frankel *et al.*, 2009, Dixit and Dave, 2008, Nanda *et al.*, 2011). Έχει παρατηρηθεί κυρίως στους μικροβιολόγους, παθολογοανατόμους, χειρουργούς, κτηνιάτρους ή κτηνοτρόφους, εφ' όσον υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος ή των βλεννογόνων Αυτό μπορεί να συμβεί όταν άφθονα μολυσματικά σωματίδια παράγονται είτε κατά τη θεραπεία με εισπνεόμενα φάρμακα είτε κατά τη βρογχοσκόπηση, είτε κατά την επεξεργασία των βιολογικών δειγμάτων. Τέλος, το *M. bovis* μεταδίδεται με το γάλα και η είσοδος γίνεται από το γαστρεντερικό σωλήνα. Το γάλα προστατεύει τα κύτταρα του μικροβίου από το γαστρικό υγρό του στομάχου. Σήμερα με τη γενίκευση της παστεριώσεως του γάλακτος εξαφανίσθηκε σχεδόν πλήρως αυτού του τύπου η φυματίωση (O'Reilly *et al.*, 1995 Jones-López *et al.*, 2013, Mariam, 2014, Humblet *et al.*, 2009).

Η πιθανότητα να μεταδοθεί η φυματίωση εξαρτάται από παραμέτρους όπως α) ο αριθμός των μυκοβακτηρίων στα πτύελα των ασθενειών, β) η υγρασία και θερμοκρασία του αέρα, γ) ο χρόνος έκθεσης, δ) οι διαστάσεις και ο αερισμός του χώρου, ε) ο ρυθμός αναπνευστικού αερισμού του πάσχοντα και στ) οι παράγοντες που σχετίζονται με την

ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή (π.χ. ανοσοκαταστολή, HIV, γαστρεκτομή, σακχαρώδης διαβήτης, σοβαρή χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αλκοολισμός) (Jones-López *et al.*, 2013, Ahmad *et al.*, 2011, Wood *et al.*, 2016, Fennelly *et al.*, 2015).

1.7 Λοιμώξεις

Η φυματίωση είναι συστηματικό νόσημα που εμφανίζεται με ποικιλία συμπτωμάτων, χωρίς όμως κανένα από αυτά να είναι παθογνωμονικό. Η κλινική εικόνα δεν είναι ειδική και ποικίλλει ανάλογα με την έκταση και τη μορφή της νόσου. Ως προς το τόπο εντόπισης της, η φυματίωση διακρίνεται σε πνευμονική και εξωπνευμονική (Lee, 2015, Ράπτης, 2006, Lee, 2015).

1.7.1 Πνευμονική φυματίωση

Οι πνεύμονες είναι το κύριο όργανο εντοπισμού της πνευμονικής φυματίωσης και είναι επίσης η κύρια οδός λοίμωξης. Τα συνηθέστερα κλινικά συμπτώματα είναι βήχας με πτύελα ή με αιμόπτυση, πυρετός, πόνους στο στήθος, εφιδρώσεις, εύκολη κόπωση, ανορεξία, απώλεια βάρους, δύσπνοια, βράγχος φωνής (λαρυγγίτιδα) και άλγος πλευριτικού τύπου (πλευρίτιδα) (Jeong *and* Lee, 2008). Πρόκειται για την πιο συχνή μορφή φυματίωσης. Είναι σημαντική η έγκαιρη διάγνωση και η αποτελεσματική θεραπεία για τη δημόσια υγεία αλλά και την πορεία της νόσου, που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Η εξέλιξη της σε κατάσταση νόσου είναι πιο συχνή σε βρέφη και σε παιδιά (χώρες με υψηλό επιπολασμό), σε ηλικιωμένους (χώρες με χαμηλό επιπολασμό), σε υποσιτισμένους, σε ανοσοκατασταλμένους από στεροειδή, σε ασθενείς με AIDS (Marais *et al.*, 2006, Alexander *et al.*, 1979). Η ενεργός φυματίωση μπορεί να διαγνωστεί με βάση την συμπτωματολογία, την ακτινογραφία θώρακος, την μικροσκόπηση πτυέλων και τη χρήση μοριακών τεχνικών. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι η ταυτοποίηση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης σε γαστρικό υγρό είναι ένδειξη πνευμονικής φυματίωσης. Τα μικρόβια μέσω της βλέννας καταπίνονται και μεταφέρονται στο στομάχι όπου δεν καταστρέφονται αφού είναι οξεάντοχα.

1.7.2 Εξωπνευμονική φυματίωση

Η εξωπνευμονική φυματίωση αναφέρεται στην περίπτωση εντοπισμού της νόσου σε οποιοδήποτε όργανο εκτός των πνευμόνων, όταν συμβαίνει αιματογενή διασπορά του *M. tuberculosis*. Σπάνια επηρεάζει την καρδιά, τους σκελετικούς μυς, το πάγκρεας και το θυρεοειδή αδένια (Agarwal *et al.*, 2005). Ανάλογα με το όργανο στο οποίο εγκαθίστανται έχουμε και την αντίστοιχη μορφή λοίμωξης. Οι λοιμώξεις είναι οι εξής: φυματιώδης πλευρίτιδα, φυματιώδης μηνιγγίτιδα, λεμφαδενίτιδα, κεχροειδής φυματίωση, φυματίωση του ουρογεννητικού συστήματος, φυματίωση των οστών και των αρθρώσεων, του περικαρδίου, του λάρυγγα, του οφθαλμού, του εντέρου κ.αλ. (Ράπτης, 2006, Heemskerk *et al.*, 2015). Η πιο κοινή εκδήλωση εξωπνευμονικής φυματίωσης είναι η λεμφαδενίτιδα (Maltezou, 2000). Η διάγνωση της εξωπνευμονικής φυματίωσης είναι πιο δύσκολη από την πνευμονική φυματίωση.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η εξωπνευμονική φυματίωση εκδηλώνεται στο 25% των ασθενών με φυματίωση που ταυτοποιούνται παγκοσμίως, το χρόνο (Loddenkemper *et al.*, 2015). Πιο συχνά εμφανίζεται στα παιδιά με ποσοστό 25-30% από ότι στους ενήλικες (15%-20%) (Munoz and Starke, 2004).

1.8 Διάγνωση

Η διάγνωση της φυματίωσης βασίζεται στην κλινική εικόνα, στο ιστορικό του ασθενούς, σε ακτινολογικά ευρήματα, στην δερματική δοκιμασία φυματίνης (TST ή αλλιώς Mantoux) και σε εργαστηριακές εξετάσεις. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ ενεργού νόσου και λανθάνουσας φυματίωσης όσον αφορά τις εργαστηριακές μεθόδους. Η συνεισφορά του μικροβιολογικού εργαστηρίου στην διάγνωση και τη διαχείριση της φυματίωσης περιλαμβάνει την ανίχνευση και απομόνωση των μυκοβακτηριδίων, τον προσδιορισμό του είδους του μυκοβακτηριδίου και τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής τους ευαισθησίας. Αυτές οι διαδικασίες είναι χρονοβόρες και χρησιμοποιούν ειδικά αντιδραστήρια και τεχνικές διαφορετικά από αυτά των υπολοίπων βακτηρίων. Επιπλέον, ο χειρισμός των μυκοβακτηριακών δειγμάτων απαιτεί ειδικές προφυλάξεις ασφαλείας, ειδικούς χώρους εργασίας, εργαστήρια επιπέδου ασφαλείας III (CDC/ATS, 1999). Οι

εργαστηριακές εξετάσεις που χρησιμοποιούνται είναι οι κλασικές και οι μοριακές τεχνικές.

Οι κλασικές μέθοδοι διάγνωσης της φυματίωσης είναι η μικροσκόπηση μετά από οξεάντοχη χρώση, η καλλιέργεια σε ειδικά θρεπτικά υλικά, η ταυτοποίηση με φαινοτυπικές μεθόδους και ο έλεγχος ευαισθησίας με τη μέθοδο MGIT 960 (Nolte and Metchock, 1995). Οι μοριακές τεχνικές στοχεύουν στην ταχεία ανίχνευση σε άμεσα κλινικά δείγματα άλλα και σε δείγματα καλλιεργείων. Στο καλλιέργημα ή και απευθείας στο κλινικό δείγμα γίνεται ταυτοποίηση του *M. tuberculosis* και ανίχνευση αντοχής κυρίως σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη (Hilleman *et al.*, 2007).

1.8.1 Συλλογή και μεταφορά κλινικών δειγμάτων

Η ανίχνευση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης είναι υψίστης σημασίας και πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην συλλογή και το χειρισμό των δειγμάτων. Η επιτυχία στην απομόνωση μυκοβακτηριδίων από κλινικά υλικά εξαρτάται από τον χειρισμό των δειγμάτων μετά τη συλλογή. Για βέλτιστα αποτελέσματα, θα πρέπει να συλλέγονται δείγματα σε καθαρά, αποστειρωμένα δοχεία και να διατηρείται υπό συνθήκες που εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων βακτηριδίων, αφού τα περισσότερα βιολογικά υλικά (π.χ. πτύελα) περιέχουν και άλλα βακτηρία. Τα δείγματα για έλεγχο της πνευμονικής φυματίωσης είναι πτύελα, βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, γαστρικό υγρό, πλευριτικό υγρό. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό κλινικών δειγμάτων είναι ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πλευριτικό υγρό, βρογχικά εκπλύματα, υλικό από αποστήματα, μυελό των οστών, και άλλα δείγματα βιοψίας (π.χ. δέρματος) στις περιπτώσεις εξωπνευμονικής φυματίωσης.

1.8.2 Μικροσκόπηση

Η μικροσκοπική παρατήρηση των οξεάντοχων μυκοβακτηριδίων αποτελεί σημαντικό βοήθημα στη γρήγορη επιβεβαίωση της μυκοβακτηριακής λοίμωξης. Πρόκειται για ευρέως χρησιμοποιούμενη, ταχεία και φθηνή τεχνική για τη διάγνωση της

φυματίωσης, που εξακολουθεί να θεωρείται μέθοδος αναφοράς στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες (Xia *et al.*, 2013, Pfyffer, 2007).

Η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος προσδίδει ένα εξαιρετικά αδιαπέραστο χαρακτήρα στα μυκοβακτηρίδια, ώστε να μην μπορούν να εφαρμοστούν οι κλασικές χρώσεις που χρησιμοποιούνται στις περισσότερες τεχνικές χρώσης, όπως Gram και Giemsa (Kremer *and* Besra 2005, Metchock *al.*, 1999, Brennan *and* Nikaido, 1995, Nikaido, 2001). Οι συνιστώμενες μέθοδοι για τη χρώση κλινικών δειγμάτων είναι είτε οι οξεάντοχες χρώσεις (Ziehl-Neelsen, Kinyon), βασισμένες στην αντοχή των μυκοβακτηριδίων στα οξέα, είτε οι χρώσεις με φθορίζουσες ουσίες (ATS, 1990;142:940–953). Ο όρος «οξεάντοχα» περιγράφει την αντοχή αυτών των μικροοργανισμών στην διατήρηση αλκαλικών χρωστικών, όπως της φαινικούχο φουξίνης, μετά από πλύση με με όξινα διαλύματα αλκοόλης. Ένα χαρακτηριστικό που αποτέλεσε τη βάση για την τεχνική της χρώσης Ziehl-Neelsen (ZN) (Brennan *and* Nikaido, 1995, Nikaido, 2001). Πρόσφατα προτάθηκε ότι αυτό είναι συνέπεια της πυκνότητας των μυκολικών οξέων του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων (Yamada *et al.*, 2013). Οι βάκιλοι φυματίωσης συνήθως εμφανίζονται ως ευθείες ή ελαφρώς κυρτές ράβδοι. Ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης και την χρόνο επώασης της καλλιέργειας, οι βάκιλοι μπορεί να ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα από μικρούς κοκκοβάκιλλους σε μεγάλες ράβδους (Palomino *et al.*, 2017). Η μικροσκοπία φθορισμού θεωρείται ότι είναι πιο ευαίσθητη, διότι οι φθορίζουσες χρωστικές μπορούν να αποκαλύψουν την παρουσία μυκοβακτηριδίων με μικρότερο αριθμό βακτηρίων (Lawn, 2015, Singhal *and* Mynneedu, 2015).

Με τη μικροσκόπηση δεν επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση των *M. tuberculosis*, από άλλα μυκοβακτηρίδια, αν και ορισμένα χαρακτηριστικά μπορεί να είναι ενδεικτικά. Το ποσοστό ευαισθησίας της χρώσης ZN υπολογίζεται μεταξύ 40 και 60% σε σύγκριση με καλλιέργεια (Singhal *and* Mynneedu, 2015), και σε άλλα δείγματα εκτός της αναπνευστικής οδού η διαγνωστική απόδοση είναι χαμηλότερη (Pathrikar *et al.*, 2020). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι νεκρά μυκοβακτηρίδια χρωματίζονται με χρώση ZN στα αρχικά στάδια της θεραπείας (Pfyffer ,2007). Επίσης, η χαμηλή ευαισθησία μπορεί ελάχιστες φορές να οδηγήσει σε αποτυχία ανίχνευσης του *M.tuberculosis* σε ασθενή με φυματίωση παρά τη συλλογή τριών δειγμάτων πτυέλων (βάσει κατευθυντήριων οδηγιών) (Dye *et al.*, 2003). Η

ειδικότητα είναι υψηλή μέχρι 98%, κυρίως σε περιοχές υψηλού επιπολασμού (Steingart *et al.*, 2006, Singhal and Mynnedu, 2015, Shoukrie *et al.*, 2018). Η μικροσκόπηση βέβαια βοηθάει αρκετά στην παρακολούθηση της φυματίωσης αφού η αρνητικοποίηση των πτυέλων είναι ένδειξη της επιτυχίας του θεραπευτικού σχήματος. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει αναγνωρίσει ότι η μικροσκόπηση με χρήση δίοδου εκπομπής φωτός (LED) διευκολύνει την αναγνώριση μυκοβακτηριδίων και συνιστά να αντικατασταθούν τα συμβατικά μικροσκοπία (Jordan and Davies PD, 2010, Trusov *et al.*, 2009).

1.8.3 Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια αποτελεί την μέθοδο αναφοράς (gold standard) της εργαστηριακής διάγνωσης της φυματίωσης αν και ο χρόνος ανάπτυξης των μικροβίων είναι μεγάλος. Είναι σημαντική μέθοδος αφού επιτρέπει την ταυτοποίηση του είδους των μυκοβακτηριδίων και τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα. Σε γενικές γραμμές, η ευαισθησία της καλλιέργειας είναι 80-85%, με ειδικότητα περίπου 98% (Morgan *et al.*, 1983, Pathrikar *et al.*, 2020, Lu *et al.*, 2011). Προϋπόθεση για την επιτυχία της είναι η κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος.

Η καλλιέργεια είναι ο χρυσός κανόνας για την εργαστηριακή επιβεβαίωση της φυματίωσης, αλλά απαιτεί 2-6 εβδομάδες επώασης (Leung *et al.*, 2012, ATS, 2000). Τα μυκοβακτηρίδια έχουν υψηλές και σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις, γι' αυτό χρειάζονται για την ανάπτυξη τους εκλεκτικά υλικά. Η ανάπτυξη και η απομόνωση γίνεται τόσο σε στερεά και όσο και σε υγρά θρεπτικά μέσα (CLSI, 2011). Όσο αφορά τα στερεά καλλιεργητικά μέσα είναι το Löwenstein-Jensen με βάση το αυγό και το μέσο Middlebrook 7H9 ή 7H10 ή 7H11 με βάση το άγαρ (Yamane *et al.*, 1996, Saito, 1998, Leung *et al.*, 2012) και επωάζονται στους 35-37°C σε ατμόσφαιρα 5-10% CO₂. Αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορεί να προστεθούν για να εμποδίσουν πιθανή επιμόλυνση από άλλα βακτήρια τα οποία έχουν μικρότερο χρόνο διπλασιασμού (CLSI, 2011). Στο Löwenstein-Jensen το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αναπτύσσεται καλά αλλά αργά, μετά από 15 ή περισσότερες μέρες επώασης σε pH 7. Οι αποικίες είναι ξηρές, τραχειές, ζαρωμένες, με

θηλίες, λευκού ή ωχροκίτρινου χρώματος. Αν τις αγγίξουμε με κρίκο θα σπάσουν και δεν ομογενοποιούνται εύκολα σε υγρό υλικό. Το Middlebrook 7H10 ή 7H11 είναι σύνθετο στερεό υλικό διαυγές και οι αποικίες *M.tuberculosis* είναι επίπεδες, τραχείες, ξηρές και ημιδιάφανες. Γενικά οι αποικίες του MTB αναπτύσσονται ταχύτερα στο θρεπτικό μέσο με βάση το άγαρ (10-20μέρες) συγκριτικά με βάση το αυγό (15-35μέρες). Ωστόσο το Löwenstein-Jensen έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από το Middlebrook 7H10 ή 7H11 (Asmar and Drancourt, 2015, Naveen and Peerapur, 2016).

Από τη δεκαετία του 1990, έχουν πιο ταχεία και ευαίσθητα συστήματα καλλιέργειας ημι-αυτοματοποιημένα και αυτοματοποιημένα χρησιμοποιώντας υγρό μέσο παρά την εξέλιξη των στερεών θρεπτικών υλικών όπως του Löwenstein-Jensen. Επί του παρόντος, συστήματα όπως το BACTEC 460TB (Becton Dickinson, NJ, USA), BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) και MB / BacT/ALERT 3D (bioMérieux, Craponne, Γαλλία), χρησιμοποιούνται ευρέως. Τα υγρά μέσα καλλιέργειας έχουν πιο σύντομο χρόνο ανάπτυξης, επομένως και ανίχνευσης του *M.tuberculosis*, και μεγαλύτερη ευαισθησία από τα στερεά καλλιεργητικά θρεπτικά υλικά (Somoskövi and Magyar, 1999, Idigoras *et al.*, 2000, Sorlozano *et al.*, 2009) Στο σύστημα BACTEC TB ανιχνεύεται η παρουσία μυκοβακτηριδίου από την παραγωγή ραδιοσημασμένου $^{14}\text{CO}_2$, λόγω διάσπασης υποστρώματος που το περιέχει (Steingart and Henry, 2006), ενώ στο σύστημα MB/BacT/ALERT 3D ανιχνεύει το παραγόμενο CO_2 μέσω ενός αισθητήρα αερίου που περιέχει χρωματομετρικό δείκτη (Piersimoni *et al.*, 2001). Η διαφορά ευαισθησία μεταξύ των δυο μεθόδων δεν είναι στατιστικά σημαντική (Yan *et al.*, 2000, Sorlozano *et al.*, 2009). Ο μέσος χρόνος ανίχνευσης του *M. tuberculosis* είναι 9 έως 14 ημέρες και τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονται μεταξύ 10-100 μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU, Colony-Forming Units) ανά ml (Pfyffer, 2007). Η απομόνωση βακτηρίων απαιτείται για τη δοκιμασία ευαισθησίας σε αντιμυκοβακτηριακά και για τον προσδιορισμού του γονότυπου (Lawn and Zumla, 2011). Το σύστημα BACTEC MGIT 960 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έλεγχο ευαισθησίας στα αντιφυματικά (Cruciani *et al.*, 2004).

Κατευθυντήριες γραμμές από το CLSI (2011) και την ATS (Αμερικανικής Θωρακικής Εταιρείας) (2007) για την καλλιέργεια του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης περιλαμβάνουν ότι τα δείγματα θα πρέπει να εμβολιάζονται σε τουλάχιστον ένα στερεό

μέσο (Lowenstein-Jensen ή παραλλαγή Middlebrook) και σε ένα υγρό σύστημα μέσου καλλιέργειας (BACTEC MGIT 960 ή MB /BacT) (Griffith *et al.*,2007).

1.8.4 Δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά με κλασικές μεθόδους

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα είναι χρήσιμος για την κατάλληλη θεραπεία ασθενών με φυματίωση. Η ταχεία ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών είναι ζωτικής σημασίας για τη θεραπεία της φυματίωσης. Για το σκοπό αυτό το CLSI θέσπισε τυποποιημένες παγκοσμίως αποδεκτές μεθόδους ελέγχου ευαισθησίας. Οι μέθοδοι αυτοί διαφέρουν από αυτές των υπολοίπων βακτηρίων (π.χ. μέθοδος διάχυσης από δισκία) για δυο λόγους (Sánchez and Kouznetsov, 2010). Πρώτον, ο ρυθμός ανάπτυξης του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης είναι αργός και δεύτερον η παρασκευή εναιωρήματος του είναι δύσκολη. Ως μέθοδοι αναφοράς προσδιορισμού της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά προτείνονται η μέθοδος των αναλογιών σε στερεό υλικό Lowenstein-Jensen και η μέθοδος αυτοματοποιημένη μέθοδος σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960 (CLSI, 2011, WHO, 2018, Piersimoni *et al.*, 2006). Δυο επιπλέον διαδεδομένες και αξιόπιστες συμβατικές μέθοδοι είναι η μέθοδος μικροαραιώσεων σε υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H10 και η μέθοδος με ταινίες διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test) σε στερεό υλικό Middlebrook (Ssenooba *et al.*, 2018, Sanic *et al.*,2000). Για κάθε μέθοδο ευαισθησίας, ο CLSI (2011) και ο Π.Ο.Υ. (2018) προτείνει διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιφυματικών φαρμάκων. Οι ίδιοι ενέκριναν ως ακριβής, αξιόπιστη και ταχύτερη την αυτοματοποιημένη μέθοδο MGIT (Palomino *et al.*, 2008, Schön *et al.*, 2017). Ωστόσο, όσον αφορά την πυραζιναμίδη η οποία απαιτεί όξινο pH, ο CLSI (2011) προτείνει ως μόνη μέθοδο τη χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων σε υγρά θρεπτικά υλικά, τα οποία μπορεί να χρησιμοποιούν όξινο pH, χωρίς να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του μικροβίου. Ο έλεγχος ευαισθησίας για τα φάρμακα 1ης γραμμής έχει προτυποποιηθεί, ωστόσο για τα δευτερεύοντα φάρμακα, καμία μέθοδος δεν έχει ακόμα διεθνή αποδοχή. Ωστόσο, προτείνεται κυρίως η μέθοδος αυτοματοποιημένη μέθοδος σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960 (van Ingen *et al.*, 2018, Ahmad, 2018). Βέβαια πλέον στα περισσότερα αναπτυγμένα κράτη, συμπεριλαμβανομένων και τις Ελλάδας, ο έλεγχος ευαισθησίας

γίνεται με συνδυασμό κλασικών (μέθοδος αναλογιών ή Bactec MGIT 960) και μοριακών τεχνικών.

1.8.5 Μοριακές τεχνικές

Η καλλιέργεια της φυματίωσης είναι μια χρονοβόρα διαδικασία και η μικροσκόπηση έχει χαμηλή ευαισθησία με κακή θετική προγνωστική αξία. Η εμφάνιση των πολυανθεκτικών στελεχών φυματίωσης αύξησε την ανάγκη για γρήγορες και ακριβείς μεθόδους διάγνωση με στόχο την άμεση και αποτελεσματική θεραπεία των ασθενών (Xu HB *et al.*, 2010). Η ταχεία διάγνωση εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση, με τις μοριακές τεχνικές να λαμβάνουν όλο και περισσότερο έδαφος στη διάγνωση της φυματίωσης. Οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την άμεση ανίχνευση του μυκοβακτηριδίου, την ταυτοποίηση, την ανίχνευση αντοχής και για επιδημιολογικούς σκοπούς.

Για την άμεση ανίχνευση του μυκοβακτηριδίου είναι διαθέσιμες διάφορες μοριακές μέθοδοι, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και πραγματικό χρόνο PCR (Real time PCR)(Eddabra *and* Ait Benhassou, 2018). Οι τεχνικές αυτές ανιχνεύουν τους βακίλους σε μικρή συγκέντρωση, διακρίνουν μεταξύ MTBC, NTM και άλλων βακτηρίων, χρησιμοποιούνται σε μεγάλη ποικιλία κλινικών δειγμάτων και δίνουν αποτέλεσμα σε λιγότερο από 48 ώρες. Αν και οι εργαστηριακά αναπτυγμένες και εμπορικές δοκιμασίες αναπτύχθηκαν κυρίως για την ανάλυση των δειγμάτων πνευμονικής, συχνά χρησιμοποιούνται και για τη διάγνωση της εξωπνευμονικής φυματίωσης (Caws *et al.*, 2000, O'Sullivan *et al.*, 2002, Pai *et al.*, 2003). Γενικότερα, οι μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση αντοχής και την παρουσία του *M. tuberculosis* Complex είναι οι τεχνικές ανάστροφου υβριδισμού, η Real-time PCR. Οι εμπορικές μοριακές μέθοδοι διάγνωσης που προτείνονται σήμερα από τον Π.Ο.Υ. για ταχεία ανίχνευση του *M. tuberculosis* και της αντοχής του στα αντιφυματικά φάρμακα είναι οι COBAS TaqMan MTB, Xpert MTB/RIF, XpertMTB/RIF Ultra, GenoType MTBDRplus και GenoType MTBDRsl (Eddabra *and* Ait Benhassou, 2018). Ωστόσο, ο Π.Ο.Υ. (2020) σε τελευταία έκθεση του σχετικά με την μοριακή ανίχνευση του *M. tuberculosis* Complex σύστησε ως αρχικός διαγνωστικός έλεγχος τις μεθόδους Xpert MTB/RIF και XpertMTB/RIF Ultra για ανίχνευση του μικροβίου σε κάθε

ηλικία, σε κάθε υλικό και για την ανίχνευση μεταλλάξεων στη ριφαμπικίνη (αντοχή), κυρίως στις περιοχές με υψηλό επιπολασμό.

Η εμπορικά διαθέσιμη εξέταση COBAS TaqMan MTB είναι μια PCR πραγματικού χρόνου που ενισχύει μέρος του γονιδίου 16S rRNA με τη χρήση ενός ανιχνευτή TaqMan για την ανίχνευση του MTBC σε κλινικά δείγματα. Μπορεί να αναλύσει μέχρι 48 δειγμάτων ταυτόχρονα σε 2,5 ώρες (Palomino ,2009). Έχει εγκριθεί για χρήση σε δείγματα πνευμονικής φυματίωσης (Eddabra and Ait Benhassou, 2018), ωστόσο πολλές μελέτες έχουν αξιολογήσει θετικά την απόδοση της σε δείγματα εξωπνευμονικής φυματίωσης (Kim *et al.*, 2011, Bloemberg *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2013, Jönssona *et al.*, 2015). Μειονέκτημα της είναι ότι δεν ελέγχει μεταλλάξεις σε αντιφυματικά φάρμακα.

Η εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος Xpert MTB / RIF είναι μια αυτοματοποιημένη εξέταση Real-time PCR που χρησιμοποιεί την πλατφόρμα GeneXpert (Blakemore *et al.*, 2010). Έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης του *M. tuberculosis* Complex και μετάλλαξη στο γονίδιο *rpoB* στην RRDR περιοχή που σχετίζεται με αντοχή στη ριφαμπικίνη, εντός δύο ωρών (Blakemore *et al.*, 2010, Zeka *et al.*, 2011, Boehme *et al.*, 2010). Έχει εγκριθεί για ανίχνευση της φυματίωσης σε ασθενής χωρίς ή με MDR-TB (οροθετικούς ή όχι) (WHO, 2013). Αρκετές μελέτες ανέφεραν ότι το Xpert MTB / RIF είναι μια ευαίσθητη μέθοδος για την ταχεία διάγνωση της φυματίωσης, σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές (Iram S *et al.*, 2015, Lombardi *et al.*, 2017), χωρίς να εξαλείφει την ανάγκη για συμβατικές μεθόδους. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανίχνευση και την ταυτοποίηση ανθεκτικών στελεχών στη ριφαμπικίνη (Ioannidis *et al.*, 2011) και στην εξωπνευμονική φυματίωση (Boehme *et al.*, 2010

Diallo *et al.*, 2016, Pandey *et al.*, 2017, Tadesse *et al.*,2015) ακόμη και σε χώρες με χαμηλό και ενδιάμεσο επιπολασμό (Lombardi *et al.*, 2017, Ozkutuk and Surucüoglu, 2014). Τα μειονεκτήματα της είναι η αδυναμία ανίχνευσης μεταλλάξεων εκτός της RRDR περιοχής και διαφοροποίησης σιωπηλών μεταλλάξεων εντός της RRDR περιοχή οδηγώντας σε αναποτελεσματική θεραπεία. Η Xpert MTB / RIF Ultra σχεδιάστηκε με την προσθήκη δύο στόχων ενίσχυσης (IS6110 και IS1081), ανιχνεύει 25 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpoB* που καλύπτουν σχεδόν όλη την περιοχή RRDR από τα κωδικόνια 510 έως 533, έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και μεγαλύτερη ειδικότητα τόσο σε θετικά όσο και σε

αρνητικά δείγματα (πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης) από την Xpert MTB / RIF (Dorman *et al.*,2018). Βάση αυτών ο Π.Ο.Υ. (2017) πρότεινε την αντικατάσταση του Xpert από το Xpert MTB / RIF Ultra. Η Cepheid Inc. δημιούργησε τη Xpert MTB / XDR, που θα ελέγχει αντοχή σε ισονιαζίδη φθοροκινολόνες και αμινογλυκοσίδες (Denkinger, 2015) και κυκλοφόρησε τον Ιούλιο του 2020.

Οι δοκιμασίες ανίχνευσης γραμμής βασίζονται στο συνδυασμός πολλαπλής PCR και ανάστροφου υβριδισμού. Έχουν αναπτυχθεί τρία εμπορικά διαθέσιμων κιτ για την ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα αντιφυματικά, το INNO-LiPA TB Mycobacteria (Viveiros *et al.*,2005), Genotype MTBDRplus (Hain LifeScience GmbH) (Yadav *et al.*, 2013, Raizada *et al.*, 2014) και GenoType MTBDRsl (Hain) (Kiet *et al.*, 2010) τα οποία ανιχνεύουν μικρό αριθμό ειδικών μεταλλάξεων στα γονίδια σχετιζόμενα με αντοχή στα αντιφυματικά. Το Genotype MTBDRplus (Έκδοση v2.0) είναι μια ποιοτική δοκιμή *in vitro* για την ταυτόχρονη ανίχνευση του *M. tuberculosis* Complex και μεταλλάξεων στα γονίδια *rpoB* για τη ριφαμπικίνη (RIF) και *inhA* και *katG* για αντοχή στην ισονιαζίδη (INH). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες ή σε άμεσα κλινικά δείγματα και διαρκεί περίπου 5,5 ώρες (Somoskoni *et al.*, 2008). Σε πολλές μελέτες έχει επιβεβαιωθεί υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση της MDR-TB φυματίωσης [Albert H *et al.*,2010, Tomasicchio *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2009]. Για την ανίχνευση του *M. tuberculosis* και την ταυτόχρονη ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα δεύτερης γραμμής αντιφυματικά χρησιμοποιείται το GenoType MTBDRsl Υπάρχουν δυο εκδόσεις της συγκεκριμένης εμπορικής εξέτασης για ανίχνευση μεταλλάξεων στις φθοροκινολόνες (λεβοφλαξίνη, οφλοξασίνη και μοξιφλοξασίνη) και στις ενέσιμες αμινογλυκοσίδες (καναμυκίνη, καπρεομυκίνη και αμικασίνη). Συγκεκριμένα ανιχνεύουν μεταλλάξεις στα γονίδια *gyrA* και *rrs*, που σχετίζονται με αντοχή σε φθοροκινολόνες και αμινογλυκοσίδες, αντίστοιχα. Η έκδοση v.1.0 ανιχνεύει επιπλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο *embB*, που σχετίζεται με αντοχή στην αιθαμβουτόλη (πρώτης γραμμής αντιφυματικό) (Theron *et al.*,2014). Ενώ, η έκδοση v.2.0 ανιχνεύει μεταλλάξεις στα γονίδια *gyrB* και *eis*, που σχετίζονται με αντοχή σε φθοροκινολόνες και αμινογλυκοσίδες, αντίστοιχα (Gardee *et al.*,2017). Ο ΠΟΥ συνέστησε τη χρήση της δοκιμασίας GenoType MTBDRsl v2.0 ως αρχική δοκιμή αντί για φαινοτυπική δοκιμασία ευαισθησίας φαρμάκων με βάση την καλλιέργεια (DST), για την ανίχνευση της

αντοχής σε φθοριοκινολόνες και σε αμινογλυκοσίδες σε ασθενείς με αντοχή στη ριφαμπικίνη ή με πολυανθεκτική φυματίωση (WHO, 2016). Μειονεκτήματα των μεθόδων Genotype MTBDR αποτελούν επιπλέον η πολυπλοκότητα των σταδίων για την εκτέλεση της και ο έλεγχος μόνο συγκεκριμένων μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή.

Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες, οι οποίες ανιχνεύουν το *M. tuberculosis* και τα άτυπα μυκοβακτηρίδια σε άμεσο κλινικό δείγμα, χωρίς όμως να ταυτοποιούν τα δεύτερα. Η διαφοροποίηση του *M. tuberculosis* από άτυπα μυκοβακτηρίδια (NTM) είναι πρωταρχικής σημασίας για τον έλεγχο της λοίμωξης και την επιλογή της αντιμικροβιακής θεραπείας. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα κιτ για Real time PCR, όπως το Anyplex MTB / NTM (Seegene), MTB Real-TM (Sacace), LyteStar TB/NTM(Altona Diagnostics) (Rahman *et al.*, 2017) και δοκιμασίες ανίχνευσης γραμμής, όπως GenoType CM/AS (Hain). Η εξέταση Anyplex MTB / NTM παρουσιάζει ευαισθησίες, εξειδικεύσεις και θετικές και αρνητικές προγνωστικές τιμές 1,00, 0,96, 0,93 και 1,00 για το σύμπλεγμα *M. tuberculosis* (MTBC) και 1,00, 0,97, 0,75 και 1,00 για ανίχνευση άτυπων μυκοβακτηρίων (NTM) αντιστοίχως, καθιστώντας τη κατάλληλη για την ανίχνευση μυκοβακτηριδίων (Perry *et al.*, 2014).

Η αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος (WGS) παρέχει μια γρήγορη και πλήρη εικόνα του γονότυπου του *M. tuberculosis* και επιτρέπει την ταυτόχρονη ταυτοποίηση όλων των γνωστών τόπων που σχετίζονται με την αντοχή με υψηλότερη συνάφεια συγκριτικά με τη δοκιμασία ευαισθησίας φαρμάκων με βάση την καλλιέργεια. Επίσης, παρέχει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού άλλων γενετικών τόπων ως αιτία αντοχής ή όχι (Nimmo *et al.*, 2017), ανεύρεσης γενετικών δεικτών που μπορεί να επηρεάσουν την πρόγνωση της θεραπείας και της μόλυνσης (Kwong *et al.*, 2015) και επιτήρησης της επιδημίας για την κατανόηση της μετάδοσης σε έναν πληθυσμό (Nikolayevskyy *et al.*, 2016, Walker *et al.*, 2013). Είναι πιο αποτελεσματική στην ανίχνευση μεταλλάξεων σχετιζόμενων με αντοχή στα διάφορα αντιφυματικά συγκριτικά με τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ (Witney *et al.*, 2016). Το WGS δεν χρησιμοποιήθηκε ως ένα διαγνωστικό εργαλείο ρουτίνας για τη φυματίωση, εξαιτίας της αρχικής ανάγκης για καλλιέργεια των δειγμάτων που διαρκεί εβδομάδες ώστε να επιτευχθεί εξαγωγή επαρκούς ποσότητας DNA (Köser *et al.*, 2013). Πρόσφατα, έχει ανακαλυφθεί μια σημαντική μέθοδος που επιτρέπει WGS

εκτελεστεί με επιτυχία απευθείας σε πτύελα (χωρίς καλλιέργεια) (Brown *et al.*, 2015, Nimmo *et al.*, 2017). Ωστόσο, το κόστος της μεθόδου είναι υψηλό με αποτέλεσμα να υπάρχει δυνατότητα εφαρμογής της ως εξέταση ρουτίνας μόνο στις χώρες υψηλού εισοδήματος (Takiff and Feo, 2015). Ένα ακόμη μειονέκτημα ο μεγάλος όγκος και η πολυπλοκότητα των δεδομένων καθώς και η ανάλυσή τους αντιπροσωπεύουν επίσης μια σημαντική πρόκληση, δείχνοντας την ανάγκη εξειδίκευσης στη βιοπληροφορική (Satta G *et al.*, 2017). Είναι απαραίτητες περαιτέρω έρευνες για τη διευκρίνιση των σημερινών αποκλίσεων μεταξύ γονότυπου και φαινοτύπου (Tögök *et al.*, 2013), καθώς και για την κατανόηση της γενετικής βάσης της αντοχής στα διάφορα αντιφυματικά, γεγονός που περιπλέκει την ερμηνεία των δεδομένων του WGS (Satta *et al.*, 2017).

1.9 Θεραπεία φυματίωσης

Το κυτταρικό τοίχωμα των μυκοβακτηριδίων διαφέρει σε δομή και χημική σύσταση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα βακτήρια, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την απορρόφηση των κοινών αντιβιοτικών και να καθιστά το *M. tuberculosis* ανθεκτικό σε αυτά (Brennan and Nikaido, 1995).

Βάση του Π.Ο.Υ και του CDC, τα αντιφυματικά φάρμακα διαχωρίζονται γενικά σε πρώτης γραμμής και δεύτερης γραμμής. Στα αντιφυματικά πρώτης γραμμής ανήκουν η ισονιαζίδη, η ριφαμπικίνη, η πυραζιναμίδα και η αιθαμβουτόλη (WHO, 2010, Ahmad and Mokaddas, 2004, Jordan and Davies, 2010) που έχουν τη μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δραστηριότητα. Οι αμινογλυκοσίδες (στρεπτομυκίνη και αμικασίνη), οι φλοουροκινολόνες, η καπρομοκίνη, το παρα-αμινοσαϊκλικό και οι θειοαμίδες (αιθιοναμίδα) αποτελούν δεύτερης γραμμής αντιφυματικά (Ahmad and Mokaddas, 2004).

Μια πιο αναλυτική κατηγοριοποίηση των αντιφυματικών φαρμάκων του Π.Ο.Υ το 2011, τα χωρίζει σε πέντε ομάδες αναλόγως της δραστηριότητας και της τοξικότητας που επιδεικνύουν (Shim and Jo, 2013, Caminero and Scardigli, 2015):

- Πρώτη ομάδα (πρώτης γραμμής φάρμακα, λήψη από του στόματος): Ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, πυραζιναμίδα και αιθαμβουτόλη).

- Δεύτερη ομάδα (ενέσιμα): στρεπτομυκίνη, αμικασίνη, καναμυκίνη και καπρεομυκίνη.
- Τρίτη ομάδα (φθοριοκινολόνες): μοξιφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη.
- Τέταρτη ομάδα (δευτερεύοντα από του στόματος): κυκλοσερίνη, αιθειοναμίδη, θειακεταζόνη, παρα-αμινοσαλυκυλικό (PAS).
- Πέμπτη ομάδα (αμφιβόλου αποτελεσματικότητας): κλοφαζαμίνη, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό, ιμιπενέμη, κλαρυθρομυκίνη, λινεζολίδη.

Σύμφωνα με τις πρόσφατες οδηγίες του Π.Ο.Υ (2017) και του CDC, τα εθνικά προγράμματα θεραπείας της φυματίωσης ακολουθούν πρότυπα θεραπευτικά σχήματα για κάθε μια από τις εξής κατηγορίες: 1/ για νέους ασθενείς με φυματίωση, 2/ για ασθενείς που έχουν λάβει αντιφυματικά φάρμακα χωρίς ανάπτυξη αντοχής, 3/ για ασθενείς με εμφάνιση ανθεκτικών μορφών φυματίωσης.

Όσον αφορά τους νέους ασθενείς με φυματίωση, τα συνιστώμενα θεραπευτικά σχήματα είναι τέσσερα για την περίπτωση ευαίσθητων στελεχών *M. tuberculosis* στα αντιφυματικά φάρμακα. Όλα αποτελούνται από δύο φάσεις: την *αρχική* φάση και την *συνεχιζόμενη* φάση. Η *αρχική* φάση διαρκεί δυο μήνες και χορηγούνται τέσσερα (ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, πυραζιναμίδη, αιθαμβουτόλη). Η *συνεχιζόμενη* φάση περιλαμβάνει δυο αντιφυματικά (ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη) και διαρκεί τέσσερις. Σε περίπτωση που ο ασθενής έχει εκτεταμένη νόσο ή σπηλαιώδη φυματίωση ή θετικές καλλιέργειες μετά από 2μηνη θεραπεία, η συνεχιζόμενη φάση θα διαρκεί τουλάχιστον 7 μήνες και άρα η συνολική θεραπεία τουλάχιστον 9 μήνες (Nahid *et al.*, 2016). Το δεύτερο και τον έκτο μήνα πρέπει να εξετάζονται τα πτύελα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας (Jordan and Davies, 2010). Η θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί με παραλλαγές στις ειδικές κατηγορίες ασθενών με φυματίωση π.χ. εγκυμονούσες, παιδιά, διαβητικούς (Joshi, 2011, WHO, 2017).

Για τη θεραπεία ασθενών που έχουν λάβει αντιφυματική αγωγή περισσότερο από ένα μήνα είναι πέντε φορές πιο πιθανό να εμφανίσουν πολυανθεκτικότητα και η θεραπευτική αγωγή πρέπει να ακολουθείται βάσει της δοκιμής ευαισθησίας στα αντιφυματικά (DST, drug susceptibility testing), αν είναι διαθέσιμα. Αν δεν είναι διαθέσιμα και οι ασθενείς επιστέφουν μετά από υποτροπή ή αποτυχίας της θεραπείας, εφαρμόζεται

εμπειρική θεραπεία βάση αυτής που ακολουθείται σε ασθενείς με πολυανθεκτική φυματίωση (WHO, 2010, WHO, 2017).

Περαιτέρω περίπλοκες επιλογές θεραπείας εμπεριέχουν ζητήματα τοξικότητας. Ανάμεσα στις πιο κοινές σοβαρές παρενέργειες της θεραπείας της φυματίωσης είναι η ηπατοτοξικότητα που εμφανίζεται σε περίπου 1-5% των ασθενών και έχει ένα ποσοστό θνησιμότητας κατά περίπτωση που πλησιάζει το 5% (Forget *and* Menzies, 2006). Αυτή και άλλες ανεπιθύμητες παρενέργειες, συμπεριλαμβανομένων των νευρολογικών και γαστρεντερικών επιδράσεων, οδηγούν σε διακοπή φαρμάκων σε σχεδόν 10% των ασθενών (Forget *and* Menzies, 2006).

Η θεραπεία των διαφόρων μορφών ανθεκτικής φυματίωσης δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά με φάρμακα πρώτης γραμμής. Οι μορφές ανθεκτικής φυματίωσης είναι οι εξής:

α/ η πολυανθεκτική φυματίωσης (MDR-TB): αντοχή σε ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη
β/ η εκτεταμένης αντοχής φυματίωσης (XDR-TB, Extensively drug-resistant tuberculosis): αντοχή σε ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, σε φθοριοκινόλη και σε τουλάχιστον ένα από τα τρία ενέσιμα φάρμακα δεύτερης γραμμής (καναμυκίνη, αμικασίνη και καπρομομυκίνη) και
γ/ η ολική ανθεκτική φυματίωση (TDR-TB, Totally Drug-Resistant tuberculosis): αντοχή σε όλα τα πρώτης και δεύτερης γραμμής αντιφυματικά.

Η ταξινόμηση των αντιφυματικών φαρμάκων άλλαξε από το 2016 και έπειτα σύμφωνα με τον WHO (2016). Από τότε και έπειτα ο WHO ταξινομεί τα αντιφυματικά σε ομάδες (A-C ή/και D) αναλόγως με την περίπτωση της αντοχής συνιστά οδηγίες για το κατάλληλο θεραπευτικό σχήμα (Tiberi *et al.*, 2017, WHO, 2020). Τα θεραπευτικά σχήματα της πολυανθεκτικής φυματίωσης μπορεί να διαρκέσουν πάνω από δυο έτη και περιλαμβάνουν αντιφυματικά με πολλές σοβαρές και ανεπιθύμητες παρενέργειες. Η μακρά διάρκεια της θεραπείας μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον κίνδυνο μη-συμμόρφωσης των ασθενών και το κόστος της θεραπείας (WHO, 2017). Επίσης, οι περιπτώσεις πολυανθεκτικής φυματίωσης εμφανίζουν υψηλά ποσοστά πρόωρης θνησιμότητας (Gandhi *et al.* 2006, Gandhi *et al.* 2010, Kim *et al.* 2008, Migliori *et al.* 2008b, Dheda *et al.* 2010). Για τον Π.Ο.Υ. είναι σημαντικό να ανακαλυφθούν και να αναπτυχθούν καινούργια υψηλής δραστηριότητας και χαμηλής τοξικότητας φάρμακα και να εφαρμοστούν καλύτερα

θεραπευτικά σχήματα για τη θεραπεία της φυματίωσης. Επιπλέον, η μείωση της διάρκειας της θεραπείας θα συμβάλει στη βελτίωση συμμόρφωσης των ασθενών σε αυτή, αποτρέποντας την εμφάνιση της περαιτέρω αντοχής στα φάρμακα (Smith *et al.*, 2013, Heemskerk *et al.*, 2015, Bothamley, 2017, Xu *et al.*, 2017).

Το 1994, ο Π.Ο.Υ. εισήγαγε το πρόγραμμα DOTS (Directly Observed Treatment, Short-Course, Άμεσα Επιτηρούμενη Θεραπεία) για την ανίχνευση και τη θεραπεία της φυματίωσης, όπου οι ασθενείς παρακολουθούνται για κάθε δόση αντιφυματικών φαρμάκων που λαμβάνουν, μέχρις το τέλος της αγωγής (WHO, 2010, WHO, 2017). Η παρακολούθηση των ασθενών κατά τη λήψη των φαρμάκων είναι σημαντική γιατί η μη συμμόρφωση τους στην θεραπευτική αγωγή είναι σημαντική αιτία στην ανάπτυξη αντοχής στα αντιφυματικά (Bishai *et al.*, 2010). Επιπλέον, το πρόγραμμα DOTS συνιστά ότι όλοι οι ασθενείς παρακολουθούνται σε μηνιαία βάση προκειμένου να αξιολογηθεί η ανταπόκριση τους στο συγκεκριμένο είδος θεραπείας. Αυτό περιλαμβάνει την υποβολή εκθέσεων που περιγράφει τα συμπτώματα του ασθενούς, τις ανεπιθύμητες παρενέργειες στο φάρμακο, την προσαρμογή εκ νέου των δόσεων του φαρμάκου εάν είναι απαραίτητο, και τον έλεγχο της συμμόρφωσης τους στη θεραπεία. Η εξέταση των πτυέλων θα πρέπει επίσης να πραγματοποιείται στην αρχήν τουλάχιστον μετά από δύο μήνες (στο τέλος της αρχικής φάσης), στον πέμπτο και έκτο μήνα θεραπείας (WHO, 2010, WHO, 2017). Ωστόσο, μόνο το ένα πέμπτο των ασθενών σε όλο τον κόσμο αντιμετωπίζονται στο πλαίσιο των προγραμμάτων DOT και ορισμένοι θεωρούν αυτά τα προγράμματα ηθικά αμφισβητήσιμα (McKinney, 2000). Η αποτελεσματικότητα του προγράμματος DOTS αντιμετωπίζει νέες δυσκολίες λόγω της αύξησης των ασθενών με MDR-TB και την εμφάνιση της XDR-TB (Saravia *et al.*, 2005, Chiang *et al.*, 2004). Αυτό οδήγησε στην εφαρμογή ενός νέου προγράμματος που ονομάζεται DOTS-plus, με στόχο την πρόληψη της περαιτέρω ανάπτυξης και διάδοσης πολυανθεκτικών στελεχών (WHO, 2017, Leung *et al.*, 2011, Yew *et al.*, 2008). Το DOTS-plus είναι τροποποίηση του προηγούμενου όπου εφαρμόζονται νέα βελτιωμένα προγράμματα όπως για παράδειγμα η εξατομικευμένη θεραπεία (Cummings, 2007, Out AA, 2013).

Όσον αφορά την εξωπνευμονική φυματίωση, η θεραπεία είναι παρόμοια με αυτή της πνευμονικής φυματίωσης. Ο ΠΟΥ συνιστά επικουρική θεραπεία με κορτικοστεροειδή

στην αρχική φάση για τη φυματίωση μηνιγγίτιδα και τη περικαρδίτιδα (WHO, 2010, WHO, 2017).

Έχουν γίνει πολλές μελέτες συσχέτισης της βιταμίνης D με τη φυματίωση. Η ανεπάρκεια της πιθανός να αποτελεί παράγοντας κινδύνου για φυματίωση. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να καθοριστεί εάν τα συμπληρώματα βιταμίνης D είναι ευεργετικά για την πρόληψη και τη θεραπεία της φυματίωσης (Huang *et al.*, 2017).

1.10 Αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα

1.10.1 Ενδογενής αντοχή

Το παχύ και υδρόφοβο μυκοβακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα είναι ένας αποτελεσματικός φραγμός διαπερατότητας σε πολλά αντιβιοτικά, και είναι μία από τις κύριες αιτίες της υψηλής, εγγενούς αντοχής στα συνήθη αντιβιοτικά (π.χ. γλυκοπεπτιδία, β-λακταμικά) των υπολοίπων βακτηρίων (Schoonmaker *et al.*, 2014). Οι στιβάδες πεπτιδογλυκάνης και αραβινογαλακτάνης περιορίζουν την είσοδο των υδρόφοβων μορίων, ενώ το στρώμα μυκολικού οξέος περιορίζει την πρόσβαση τόσο των υδρόφοβων όσο και των υδρόφιλων μορίων (Brennan and Nikaido, 1995, Liu *et al.*, 1995). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ή γονίδια που πιθανόν να συμβάλουν σε αυτό. Το *M. tuberculosis* είναι γνωστό ότι περιέχει πολλά γονίδια που κωδικοποιούν αντλίες εκροής (30, 36-2.βοήθεια). Έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν αντλίες εκροής δημιουργεί αντοχή σε διαφορετικά φάρμακα στα διάφορα μυκοβακτηρίδια, καθιστώντας εμφανή τη συμμετοχή των μηχανισμών των αντλιών εκροής στην ενδογενή αντοχή στα αντιβιοτικά. Παράδειγμα αποτελούν οι αντλίες εκροής που σχετίζονται κυρίως με την αντοχή στις τετρακυκλίνες και στην χλωραμφενικόλη (Aínsa *et al.*, 1998, De Rossi E *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2004, Li and Nikaido, 2004, Silva *et al.*, 2001).

Εκτός από τις αντλίες εκροής, τα μυκοβακτηρίδια παράγουν κάποια ένζυμα, όπως β-λακταμάσες, που ευθύνονται για την εγγενή αντοχή στις β-λακτάμες στο μυκοβακτηρίδιο φυματίωσης (Flores *et al.*, 2005). Το *erm37* γονίδιο κωδικοποιεί την 23S

rRNA μεθυλτρανσφεράση, η οποία είναι υπεύθυνη για την εγγενή αντοχή στις μακρολίδες (Madsen *et al.*, 2005, Andini N *et al.*, 2006).

Έχει αναφερθεί ότι το γονίδιο *whiB7*, ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής, ήταν υπεύθυνος για την εγγενή αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά, όπως η ερυθρομυκίνη, χλωραμφενικόλη, κλαριθρομυκίνη, τετρακυκλίνη. Αποδείχθηκε ότι το γονίδιο *whiB7* είναι ένας ρυθμιστής που μπορεί να εμπλέκεται στην επαγωγή ορισμένων γονιδίων που περιγράφηκαν προηγουμένως, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου που κωδικοποιεί τη αντλία εκροής Tap (Aínsa *et al.*, 1998, Morris *et al.*, 2005, Ramon-Garcia *et al.*, 2012), ή το γονίδιο *erm37* (Burian *et al.*, 2012, Burian *et al.*, 2013, Morris *et al.*, 2005). Υπάρχουν 7 γονίδια *whiB* στο *M.tuberculosis* (*whiB1-whiB7*) που επάγονται από διαφορετικές συνθήκες στρες και αντιβιοτικών.

1.10.2 Σχέση μεταξύ εγγενούς αντοχής και γενετικής αντοχής

Είναι πλέον γενικά αποδεκτό ότι η συνολική βακτηριακή αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες δεν οφείλεται μόνο σε ένα μηχανισμό αντοχής, αλλά σε συνέργεια μεταξύ εγγενούς αντοχής και γενετικής αντοχής (Nikaido, 2009). Ως παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι οι μηχανισμοί εκροής εμφανίζονται πριν από την απόκτηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο και η υπερπαραγωγή αντλιών εκροής οδηγεί σε αύξηση αντοχής του αντιβιοτικού (Baucheron *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2006). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ο συνδυασμός μιας μειωμένης διαπερατότητας εξωτερικής μεμβράνης, λόγω τροποποιήσεων της πορίνης, και μιας αυξημένης δραστηριότητας των αντλιών εκροής, μειώνει τη συγκέντρωση αντιβιοτικού στο κύτταρο (Davín-Regli *et al.*, 2008; Mallea *et al.*, 1998; Viveiros *et al.*, 2007). Αυτό επιτρέπει στα βακτήρια να επιβιώσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από ό, τι αναμενόταν παρά την χορήγηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού, προσδίδοντας ένα φαινότυπο αντοχής χαμηλού επιπέδου. Είναι πιθανό ότι αυτή η παρατεταμένη επιβίωση υπό την παρουσία του αντιβιοτικού μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα των αυθορμήτων μεταλλάξεων στα στελέχη, τα οποία περιέχουν μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη στόχο, να βγουν από αυτό το υποπληθυσμό βακτηρίων παρουσιάζοντας ένα φαινότυπο

υψηλού επιπέδου αντοχής (Pagès *et al*, 2009; Piddock, 2006, Quinn T. *et al*, 2006). Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση της μακροχρόνιας θεραπείας όπως αυτή που χρησιμοποιείται στη θεραπεία της φυματίωσης, όπου μια παρατεταμένη πίεση υπο-ανασταλτικών συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη δραστηριότητα εκροής και να επιτρέψει την επιλογή των μεταλλαγμένων στελεχών, καθιστώντας έτσι τον οργανισμό ανθεκτικό σε αυτό το αντιφυματικό.

1.10.3 Επίκτητη αντοχή

Η επίκτητη αντοχή συμβαίνει όταν ευαίσθητα βακτήρια καθίστανται ανθεκτικά σε αντιβιοτικά ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε χρωμοσωμικά γονίδια (Heym *et al*. 1994). Η εμφάνιση των ανθεκτικών στελεχών στα αντιφυματικά φάρμακα σχετίζεται με το μεγάλο χρόνο διπλασιαμού του *M. tuberculosis*, τη χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και την ικανότητα για αδράνεια (Wayne, 1994).

Το *M. tuberculosis* είναι σε θέση να αποκτήσει αντοχή από μετάλλαξη σε χρωμοσωμικά γονίδια του. Αυτός πιθανώς είναι ο πιο αποτελεσματικός μηχανισμός αντοχής κάθε αντιφυματικού αντιβιοτικού. Καμία οριζόντια μεταφορά γονιδίων αντοχής δεν έχει αναφερθεί για το *M. Tuberculosis*. Ωστόσο, τα κινητά γενετικά στοιχεία, όπως αλληλουχία εισαγωγής IS6110, έχουν συσχετιστεί με αντοχή μέσω της αδρανοποίησης κρίσιμων γονιδίων (Gillespie, 2002, Böttger *and* Springer, 2008, Dale, 1995). Η συσσώρευση μεταλλάξεων σε διαφορετικά γονίδια που εμπλέκονται στην αντοχή σε μεμονωμένα φάρμακα έχει ως αποτέλεσμα της ανάπτυξη πολυανθεκτικών στελεχών, και αυτό έχει αποδοθεί στην ακανόνιστη χορήγηση του φαρμάκου, σε ακατάλληλη θεραπεία και σε κακή συμμόρφωση των ασθενών στην αντιφυματική αγωγή (Zhang *et al.*, 2000, Varelzdis *et al.*, 1994).

1.10.4 Αντοχή στην ισονιαζίδη

Η ισονιαζίδη (υδραζίνη του ισονικοτινικού οξέος, INH) είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά και από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρώτης γραμμής αντιφυματικά φάρμακα. Χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία, στην χημειοπροφύλαξη (Vilchèze *and* Jacobs, 2007) και στην λανθάνουσα φυματίωση (Bernstein *et al.*, 1952, Fox, 1952). Πρόκειται για συνθετικό φάρμακο με βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στον βάκιλλο της φυματίωσης στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Η INH είναι ιδιαίτερα δραστική κατά των βραδέως αναπτυσσόμενων μυκοβακτηριδίων (Pansy F. *et al.*, 1952) και δεν είναι δραστική έναντι μη πολλαπλασιαζόμενων βακίλλων ή υπό αναερόβιες συνθήκες. Πιστεύεται ότι η INH εισέρχεται στα μυκοβακτηρίδια μέσω παθητικής διάχυσης διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος και ότι είναι ενεργή μόνο κατά τη διαίρεση βακτηριδίων (Bardou *et al.*, 1998, Mitchison *et al.*, 1956).

Η ισονιαζίδη είναι ένα προφάρμακο και απαιτεί ενεργοποίηση από το βακτηριακό ένζυμο καταλάση/ υπεροξειδάση που ονομάζεται KatG και κωδικοποιείται από το γονίδιο *katG*, για να δράσει (Zhang *et al.*, 1992). Η ενεργοποιημένη μορφή της INH αναστέλλει τη βιοσύνθεση του μυκολικού οξέος μέσω του ενζύμου ενυλο-ACP ρεδουκτάση γνωστή ως αναγωγάση InhA η οποία εξαρτάται από NADH και κωδικοποιείται από το γονίδιο *inhA* (Palomino *and* Martin, 2014, Almeida *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, το ένζυμο KatG ενεργοποιεί την INH παράγοντας μια σειρά από εξαιρετικά δραστικά είδη όπως υπεροξειδίο, ρίζα υδροξυλίου (Shoeb *et al.*, 1985), ρίζα ισονικοτινικού οξέος (Wilming *and* Johnsson, 1999). Η ενεργοποιημένη ρίζα INH ή ισονικοτινική ακύλ ρίζα, η υποτιθέμενη δραστική μορφή της INH, συνδέεται ομοιοπολικά με τον δακτύλιο νικοτιναμιδίου του NAD⁺ (δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου αδενίνης), σχηματίζοντας το ισοτονικό-ακυλο-NADH (INH-NAD) (Rawat *et al.*, 2003, Rozwarski *et al.*, 1998). Το τελευταίο συνδέεται στενά στην θέση ενεργοποίησης του ενζύμου αναγωγάση InhA (Rawat *et al.*, 2003, Wahab *et al.*, 2009). Η InhA είναι η αναγωγάση της ενούλο-ακυλο-μεταφορέα πρωτεΐνη (enoyl-acyl-carrier protein, enoyl-ACP), η οποία είναι συστατικό του συστήματος της συνθάσης II των λιπαρών οξέων (fatty acid synthase type II (FASII) system) των μυκοβακτηριδίων. Με την αναστολή της αναγωγάσης, προκαλείται συσσώρευση των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας και αναστέλλεται η σύνθεση των μυκολικών οξέων, που απαιτούνται για τα

μυκοβακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα (Dessen *et al*, 1995, Marrakchi *et al*, 2000, Quemard *et al*, 1995), οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο (Takayama *et al*, 1972, Vilchère *et al*, 2000, Lei *et al*, 2000, Vilchère *et al*, 2007, Vilcheze *et al*, 2006). Οι σημαντικότερες ανεπιθύμητες παρανέργειες από τη χορήγηση της ισονιαζίδης είναι η ηπατοτοξικότητα και η νευροτοξικότητα (Jnawali *and* Ryoo, 2013).

Αν και οι μοριακοί μηχανισμοί της αντίστασης στην ισονιαζίδα δεν είναι πλήρως κατανοητοί, πολυάριθμες μελέτες την έχουν συνδέσει με διαφορετικές μεταλλάξεις σε διάφορους γενετικούς τόπους του γονιδιώματος του *M. tuberculosis*. Οι μεταλλάξεις αφορούν κυρίως το γονίδιο *katG* ή την περιοχή του προαγωγέα και τη δομική περιοχή των γονιδίων *inhA* και *ahpC*, που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των μυκολικών οξέων (Wang *et al*, 2011, Ramaswamy *et al*, 2003, Hazbón *et al*, 2006). Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα γονίδια και οι πιθανοί μηχανισμοί που έχουν συσχετιστεί με αντοχή στην ισονιαζίδα.

1.10.4.α Γονίδιο *katG*

Το γονίδιο *katG* (Rv1908c) κωδικοποιεί το ένζυμο υπεροξειδάση/ καταλάση, το οποίο ενεργοποιεί την INH (Damtie *et al*, 2014). Οι μεταλλάξεις σε στελέχη *M. tuberculosis* με αντοχή στην INH ανιχνεύονται συχνότερα στο γονίδιο *katG*, που εμφανίζονται σε ποσοστό 30-95% των περιπτώσεων (ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή), μειώνοντας έτσι την ικανότητα του ενζύμου KatG να ενεργοποιεί το προφάρμακο INH (Vilchère *and* Jacobs, 2014). Μείωση ή ολική απώλεια δραστηριότητας καταλάσης / υπεροξειδάσης και συνεπώς μειωμένη ικανότητα σχηματισμού INH-NAD που αναστέλλει το ένζυμο, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο γονίδιο *katG* είναι οι συνηθέστερες γενετικές μεταβολές που σχετίζονται με αντοχή στην INH (Zhang *et al*, 1992, Middlebrook, 1954, Heym *et al*, 1995) και προσδίδουν κυρίως υψηλού επιπέδου αντοχή στην INH.

Το γονίδιο *katG* βρίσκεται σε μια εξαιρετικά μεταβλητή περιοχή του γονιδιώματος του *M. tuberculosis* που περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες μπορεί να αποτελούν την αιτία για την αστάθεια της περιοχής και την εμφάνιση υψηλής συχνότητας μεταλλάξεων των στελεχών με αντοχή στην INH (Zhang *and* Young, 1994). Έχουν

παρατηρηθεί μεταλλάξεις παρανοηματικές (missense), μη νοηματικές (nonsense), σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν υποκατάσταση απλού αμινοξέος ή πρόωρο τερματισμό, μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου λόγω ενθέσεων ή διαγραφών βάσεων, αποκοπές (truncation) και μερική ή πλήρη διαγραφή γονιδίου (Ramaswamy *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 1992, Zhang *et al.*, 2005, Augustynowicz-Korec *et al.*, 2003). Ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης και τον βαθμό με τον οποίο διατηρείται η λειτουργία του ενζύμου KatG, η προκύπτουσα ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της INH μπορεί να κυμαίνεται από 0,2 έως 256 mg/L, προσδίδοντας χαμηλού έως υψηλού επιπέδου αντοχή. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερες από τριακόσιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* που οδηγούν σε αδρανοποίηση ενζύμου KatG και κυμαίνονται από χαμηλού ως κυρίως υψηλού επιπέδου αντοχής (Zhang *et al.*, 1992, Vilchèze and Jacobs, 2007). Οι σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* παρατηρούνται συχνότερα σε σύγκριση με άλλους τύπους μεταλλάξεων.

Η πιο διαδεδομένη σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *katG* είναι η υποκατάσταση της σερίνης σε θρεονίνη στο κωδικόνιο 315 (S315T), αντιπροσωπεύοντας την πλειοψηφία των στελεχών με αντοχή στην INH (Marttila *et al.*, 1998, Abate *et al.*, 2001, Mokrousov *et al.*, 2002, Hazbon *et al.*, 2006, Guo *et al.*, 2006, Ramaswamy *et al.*, 2003; 47: 1241–50, Vilchèze and Jacobs, 2007, Banerjee A *et al.*, 1994, Brossier *et al.*, 2006, van Soolingen *et al.*, 2000). Αυτή η μεταλλαγή οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα οξειδωσης της INH, δημιουργώντας ένα εξαιρετικά ανεπαρκές προϊόν INH που είναι ανίκανο να σχηματίσει το σύμπλοκο INH-NAD (Zhang *et al.*, 1992, Vilchèze and Jacobs, 2007, Wengenack *et al.*, 1997, Saint-Joanis *et al.*, 1999). Με αυτό τον τρόπο η μετάλλαξη S315T προσδίδει στο μυκοβακτήριο ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα, διατηρώντας τη δραστικότητα καταλάσης /υπεροξειδάσης (Pym *et al.*, 2002) και αναστέλλοντας την αντιμικροβιακή δράση της ισονιαζίδης. Είναι ενδιαφέρον ότι έχει αποδειχθεί ότι η μετάλλαξη S315T στο γονίδιο *katG* συμβαίνει συχνότερα σε στελέχη MDR από ό,τι σε μονό-ανθεκτικά στελέχη στην INH (Rindi *et al.*, 2005, van Soolingen *et al.*, 2000, Marttila *et al.*, 1998). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να σχετίζεται με υψηλή ικανότητα μετάδοσης και μολυσματικότητας των στελεχών που την φέρουν (Gagneux *et al.*, 2006, Pym *et al.*, 2002) και κυρίως των MDR-TB και XDR-TB (Ano *et al.*, 2008). Στελέχη της οικογένειας Beijing

διαφόρων χωρών συνήθως φέρουν μεγαλύτερο ποσοστό της υποκατάστασης S315T συγκριτικά με στελέχη άλλων γονοτύπων (Li *et al.*, 2010, Park, *et al.*, 2005, Lipin, *et al.*, 2007, Mokrouson *et al.*, 2002). Αυτές οι μεταλλάξεις πιθανώς ευνοούνται επειδή μειώνουν την ενεργοποίηση της INH χωρίς να καταργούν τη δραστικότητα της καταλάσης-υπεροξειδάσης και επομένως χωρίς να μειώνουν τη λοιμογόνο δράση ή τη μεταδοτικότητα των στελεχών του *M. tuberculosis* (Dalla Costa *et al.*, 2009). Εκτιμάται ότι αυτή η μεταλλαγή δεν προκαλεί γενετικό κόστος (fitness cost), ενώ η υπερέκφραση θα προκαλούσε (Hazbón *et al.*, 2006, van Doorn *et al.*, 2006, Pym *et al.*, 2002). Η μεταδοτικότητα, η λοιμογόνος δύναμη και η ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία φαίνεται να επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις του γονιδίου *katG* (Escalante *et al.*, 2013).

Η σερίνη στο κωδικόνιο 315 έχει βρεθεί ότι μπορεί να αντικατασταθεί επιπλέον από τα αμινοξέα Asn (Wei *et al.*, 2003), Arg (Unissa *et al.*, 2011), Ile (Hazbón *et al.*, 2006), Gly (Suarez *et al.*, 2009), Leu (Araya *et al.*, 2011) με αντοχή που κυμαίνεται από χαμηλού επιπέδου έως υψηλού επιπέδου (Brossier *et al.*, 2011). Βιοχημικές αναλύσεις άλλων μεταλλάξεων στο γονίδιο *katG* έδειξαν ένα ευρύ φάσμα δράσεων υπεροξειδάσης/καταλάσης. Εντούτοις, το επίπεδο της αντοχής στην INH δεν μπορεί να οριστεί από τη θέση της μετάλλαξης: Οι υποκαταστάσεις K46STOP, D94A, H108E, L101P, I335T, S160L, W341G, Q294STOP, W299G, A350S G494D και R595STOP παρουσιάζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στην INH (Ramaswamy and Musser, 1998, Heym *et al.*, 1999, Jagielski *et al.*, 2014), ενώ οι υποκαταστάσεις L141F, E553K και F658V σχετίζονται με INH χαμηλού επιπέδου αντίσταση (Ramaswamy and Musser, 1998). Η αντικατάσταση R463L στο γονίδιο *katG*, συχνά συναντάται με άλλες μεταλλάξεις *katG* (Ramaswamy and Musser, 1998, Musser, 1995) και έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία της λευκίνης αντί της αργινίνης στο κωδικόνιο 463 δεν επηρέασε τη δραστικότητα καταλάσης/υπεροξειδάσης (Rouse *et al.*, 1996).

1.10.4.β Γονίδιο *inhA* και περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου (*mabA-inhA*)

Το γονίδιο *inhA* κωδικοποιεί το ένζυμο InhA, που εμπλέκεται στη σύνθεση των μυκολικών οξέων του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο δρα ως στόχος για ενεργοποιημένο INH (Banerjee *et al.*, 1994). Μεταλλάξεις στην δομική περιοχή ή την

περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *inhA* έχει αποδειχθεί ότι προσδίδουν αντοχή στην INH. Έχουν συσχετιστεί με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην INH και εμφανίζονται λιγότερο συχνά από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* (Zhang and Telenti, 2000, Hazbón *et al.*, 2006). Στις περιοχές αυτές έχουν βρεθεί πολυάριθμες σημειακές μεταλλάξεις σε στελέχη *M. tuberculosis* με αντοχή στην INH, άλλα δεν έχουν παρατηρηθεί ενθέσεις ή διαγραφές.

Γενικότερα, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *inhA* οδηγούν σε χαμηλότερη συγγένεια του ενζύμου InhA με την ενεργοποιημένη INH είτε μέσω δομικών αλλαγών που μεταβάλλουν την δομή του ενεργού κέντρου είτε εντός της ίδιας της δραστικής θέσης (Oliveira *et al.*, 2006, Rozwarski *et al.*, 1998). Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη στο γονίδιο *inhA* είναι η μετάλλαξη S94A, που βρίσκεται στη θέση πρόσδεσης του NADH στην αναγωγή InhA (Quemard *et al.*, 1995, Banerjee *et al.*, 1994), προσδίδοντας αντοχή στην INH. Αυτή η μετάλλαξη μειώνει την συγγένεια του ενζύμου InhA με το σύμπλοκο INH-NAD (Vilcheze *et al.*, 2006, Zhang and Yew, 2009). Έχουν αναφερθεί αρκετές κλινικά σημαντικές μεταλλάξεις στη δομική περιοχή του γονιδίου *inhA*, όπως V78A, I16T, I159T, D256N, R202G (Whitney and Wainberg, 2002, Ramaswamy and Musser, 1998, Huang *et al.*, 2009, Basso *et al.*, 1998, Ristow *et al.*, 1995, Yoon *et al.*, 2012), καθώς επίσης και μεταλλαγές σε ευαίσθητα στελέχη, όπως I47T, I194T, T253A (Basso *et al.*, 1998, Yoon JH *et al.*, 2012, Hazbón *et al.*, 2006, Ramaswamy *et al.*, 2003). Ωστόσο, κάποιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *inhA* συνήθως συνυπάρχουν με μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* ή στην περιοχή προαγωγέα του γονιδίου *inhA* (Basso *et al.*, 1998, Musser *et al.*, 1996, Guo *et al.*, 2006, Hazbón *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2005).

Οι Banerjee *et al.* ανέφεραν ότι οι μεταλλάξεις στην γενετική περιοχή που περιέχει τα δύο συνεχόμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs, open reading frame) των γονιδίων *mabA* και *inhA* είναι υπεύθυνες για την αντοχή στην INH, υποδεικνύοντας την περιοχή *mab-inhA* ή αλλιώς περιοχή προαγωγέα του *inhA*. Οι μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή προκαλούν υπερέκφραση του ενζύμου InhA οδηγώντας σε αντοχή στην INH. Στο *M.tuberculosis*, τα γονίδια *mabA* και *inhA* αποτελούν ένα οπερόνιο, άλλα μόνο το γονίδιο *inhA* κωδικοποιεί την αναγωγή InhA (Banerjee *et al.*, 1998, Zhang and Yew, 2009). Αυτές αποτελούν τον δεύτερο πιο συχνό μηχανισμό αντοχής στην INH μετά τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* (Herrera *et al.*, 2004, Kiepiela *et al.*, 2000, Cardoso *et al.*, 2004). Οι

μεταλλάξεις, ιδιαίτερα οι c-15t, t-8c, c-17t σε αυτή την περιοχή αποτελούν την πιο κοινή αιτία χαμηλού επιπέδου αντοχής στην INH (Ramaswamy *and* Musser, 1998, Musser *et al.*, 1996, προκαλώντας υπερέκφραση του ενζύμου InhA (Rozwarski *et al.*, 1998). Η πλέον διαδεδομένη και δεύτερη πιο συχνή μετάλλαξη είναι η c-15t, η οποία σχετίζεται με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην INH (Guo *et al.*, 2006, Hazbon *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2005). Σε μια μελέτη αποδείχθηκε ότι αυξάνει τα επίπεδα mRNA του *inhA* κατά 20 φορές, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του ενζύμου InhA, οδηγώντας σε οκταπλάσια αύξηση της MIC της INH σε *M. tuberculosis* (Vilchèze *et al.*, 2007). Έχει αναφερθεί ότι και στις περιπτώσεις στελεχών με μεταλλάξεις ταυτόχρονα στην δομική περιοχή και στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *inhA* η αντοχή είναι χαμηλού επιπέδου (Brossier *et al.*, 2006). Μοριακά δεδομένα κλινικών στελεχών υποδεικνύουν ότι η γενετική στρατηγική που υιοθετείται από το *M.tuberculosis* δεν εξαρτάται πρωτίστως από τη μετάλλαξη στη θέση πρόσδεσης για σχηματισμό προσαγωγού, αλλά από την υπερπαραγωγή του ενζύμου InhA με απόκτηση σημειακών μεταλλάξεων στην περιοχή *mab-inhA*. Ωστόσο, στις περιπτώσεις ταυτόχρονων μεταλλάξεων στο γονίδιο *katG* και στον υποκινητή του γονιδίου *inhA* προσδίδεται υψηλού επιπέδου αντοχή στην INH (Heym *et al.*, 1995, Guo *et al.*, 2006). Τα δεδομένα σχετικά με τις συχνότητες των μεταλλάξεων στον προαγωγέα του γονιδίου *inhA* και κυρίως της c-15t μεταξύ στελεχών με μονοαντοχή στην INH και MDR-TB είναι αντικρουόμενα. Μερικοί συγγραφείς ανέφεραν υψηλότερη αναλογία μεταλλάξεων σε MDR-TB στελέχη (Jagielski *et al.*, 2014, Afanas'ev *et al.*, 2007, Hillemann *et al.*, 2005, Hazbón *et al.*, 2006, Boonaiam *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2010), κάποιιοι σε στελέχη με μονοαντοχή (Leung *et al.*, 2006), ενώ άλλοι δεν έχουν βρει διαφορά μεταξύ των δύο φαινοτυπικών ομάδων (Baker *et al.*, 2005).

1.10.4.γ Διαγονιδιακή περιοχή *furA-katG* και γονίδιο *furA*

Στο *M. tuberculosis*, ακριβώς ανοδικά του *katG* ευρίσκεται το γονίδιο *furA* (ferric uptake regulation) (Rv1909c), ένα ομόλογο του ρυθμιστή πρόσληψης σιδήρου, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ρύθμισης πρόσληψης σιδήρου (Cole *et al.*, 1998, Pym *et al.*, 2001, Zahrt *et al.*, 2001.). Το γονίδιο *furA* μπορεί να ρυθμίσει το γονίδιο *katG* και άλλα

γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεση. Πρόκειται για αρνητικό ρυθμιστή του γονιδίου *katG*. Έχει βρεθεί ότι τα γονίδια *furA* και *katG* συν-μεταγράφονται από μία κοινή ρυθμιστική περιοχή που βρίσκεται στο γονίδιο *furA* (Pym *et al.*, 2001). Τα γονίδια είναι εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ των μυκοβακτηρίων και επάγονται μετά από οξειδωτικό στρες (Sala *et al.*, 2003). Ο FurA φαίνεται να είναι κυρίαρχος ρυθμιστής του οξειδωτικού στρες. Η διαγραφή του γονιδίου *furA* στο *M. tuberculosis* έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου *katG* και την υπερευαισθησία στην INH (Pym *et al.*, 2001). Μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο *furA* καθώς και στην περιοχή των 38 bp μεταξύ των γονιδίων *furA* και *katG*. Μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις (όπως η A14V) στο γονίδιο *furA* μπορεί να μην επηρεάσουν την έκφραση του *katG*, ενώ η διαγονιδική περιοχή *furA-katG* (όπως οι a-10c, g-7a, g-12a) συσχετίστηκε με μείωση δραστηριότητας οξείδωσης της INH και με χαμηλού επιπέδου αντοχή σε INH (Ando *et al.*, 2011, Ramaswamy *et al.*, 2003). Μεταλλάξεις στο γονίδιο *furA* (όπως οι S5P, A14V, C97Y, A139V, T275P) έχουν εντοπιστεί με μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια και κυρίως στο γονίδιο *katG* (Ramaswamy *et al.*, 2003, Pym *et al.*, 2002, Ando *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2005). Σε αρκετές μελέτες έχει αναφερθεί η μετάλλαξη A43V στο γονίδιο *furA* σε ανθεκτικά και σε ευαίσθητα στελέχη *M. bovis* BCG (Wang *et al.*, 2010, Springer *et al.*, 2001, 69(10):5967-5973).

1.10.4.δ Διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* και γονίδια *ahpC* και *oxyR*

Οι μεταλλάξεις στη διαγονιδιακή περιοχή *ahpC-oxyR* (intergenic region) έχει βρεθεί ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αντοχή στην INH στο *M. tuberculosis*. Το γονίδιο *ahpC* κωδικοποιεί την αναγωγή αλκυλοϋπεροξειδίου (AhpC alkyl hydro peroxidase, αλκυλοϋδροϋπεροξειδάση), που πραγματοποιεί τη μείωση υποστρώματος υπεροξειδίων. Έχει προταθεί ότι συμμετέχει στην προστασία των μυκοβακτηρίων από τις επιβλαβείς επιδράσεις των προϊόντων των δραστικών ενδιάμεσων μορφών οξυγόνου (ROI, reactive oxygen intermediates) και αζώτου (RNI, reactive nitrogen intermediates) και ότι εμπλέκεται στην αντοχή στην ισονιαζίδη (INH) (Deretic *et al.*, 1996, Dhandayuthapani *et al.*, 1996, Master *et al.*, 2002, Sherman, *et al.*, 1996, Springer *et al.*, 2001). Επιπλέον,

παρατηρήθηκε ότι εκφράζεται μόνο υπό συνθήκες στατικής ανάπτυξης στο *M. tuberculosis* (Springer *et al.*, 2001). Το γονίδιο *ahpC* συνδέεται με το γονίδιο *oxyR* και είναι υπό τον έλεγχο του. Βρίσκεται καθοδικά (downstream) του και ενεργοποιείται από το γονιδιακό του προϊόν, ελέγχοντας την αντίδραση του υπεροξειδικού στρες στα μυκοβακτηρίδια (Aslund, *et al.*, 1999).

Το OxyR, ο κεντρικός ρυθμιστής βακτηριακής απόκρισης στο οξειδωτικό στρες (Hausladen *et al.*, 1990), είναι εκπληκτικά ανενεργός (Deretic *et al.*, 1995, Deretic *et al.*, 1997, Sherman *et al.*, 1995). Το γονίδιο *oxyR* του *M. tuberculosis* είναι μη λειτουργικό, επειδή η περιοχή κωδικοποίησης περιέχει πολλαπλές μετατοπίσεις πλαισίων και διαγραφές. Αυτή η αδρανοποίηση συμμετέχει στην αυξημένη ευαισθησία στην INH, παρέχοντας μια εξήγηση για την υψηλή ευαισθησία του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης σε αυτό το φάρμακο (MIC των 0,05 mg/L) (Pagan-Ramos *et al.*, 2006). Παρά την απώλεια του OxyR, διατηρούνται αρκετά από τα γονίδια απόκρισης στο οξειδωτικού στρες του *M. tuberculosis*, όπως το γονίδιο *ahpC*.

Η έκφραση του ενζύμου AhpC ρυθμίζεται συντονισμένα μαζί με το ένζυμο KatG σε απάντηση σε οξειδωτικό στρες. Καθώς τα AhpC και KatG σχηματίζουν δύο ένζυμα ενός ρεγουλονίου (regulon), η έκφρασή τους ρυθμίζεται από το OxyR (Slayden and Barry, 2000, Storz and Imlay, 1999). Έχει προταθεί ένας προστατευτικός ρόλος για το AhpC με βάση την ικανότητά του να μεσολαβεί στην υπερευαισθησία και την αντοχή στην INH (Dhandayutharani *et al.*, 1996). Παρόλο που η έκφραση του ενζύμου KatG μπορεί να ρυθμίζεται κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες με ένα τρόπο ανεξάρτητο από το OxyR (Sherman *et al.*, 1996, Sherman *et al.*, 1995), το *ahpC* (εξαρτώμενο από το *oxyR*) μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα του KatG μέσω των βασικών επιπέδων υπεροξειδίων που παράγονται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής αερόβιας ανάπτυξης (Slayden and Barry, 2000).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ahpC* είναι ένας τρόπος με τον οποίο το κύτταρο μπορεί να διατηρήσει την ενεργότητα αποτοξίνωσης (Ramaswamy and Musser, 1998, Rinder *et al.*, 1998). Έτσι, μερικές μελέτες υποδηλώνουν ότι οι μεταλλάξεις στο *katG* όχι μόνο οδηγούν σε απώλεια δραστηριότητας καταλάσης-υπεροξειδάσης, αλλά επίσης ευνοούν μεταλλάξεις στον προαγωγέα του *ahpC* (Ramaswamy and Musser, 1998). Τα κλινικά

δεδομένα που προέρχονται από διάφορες περιοχές εγείρουν επίσης το ερώτημα σχετικά με την ανεξάρτητη συμβολή του AhrC όταν απουσιάζουν συναφείς μεταλλάξεων στο γονίδιο *katG* (Ramaswamy and Musser, 1998). Οι Zhang *et al.*, πρότειναν έναν ανεξάρτητο ρόλο των μεταλλάξεων στο γονίδιο *ahpC* στην εμφάνιση χαμηλού επιπέδου αντοχής στην INH (Zhang *et al.*, 1996). Πρόσφατα σε μια ανάλυση ολόκληρου γονιδιώματος του *M.tuberculosis*, βρέθηκε ένα στέλεχος με ενδιάμεση αντοχή στην ισονιαζίδη που έφερε την μετάλλαξη Gly32Ser με ταυτόχρονη υποκατάσταση Ala220Val στο γονίδιο *fadE24* (Lempens *et al.*, 2018). Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *ahpC*, όπως P2S (Lee *et al.*, 1999), L3K (Kiepiela *et al.*, 2000), L4R (Valvatne *et al.*, 2009), F10I (Silva *et al.*, 2003), T5I (Muller *et al.*, 2011) με ταυτόχρονη αντοχή στο γονίδιο *katG*.

Περίπου 29% των κλινικών στελεχών με αντοχή στην INH περιέχουν μεταλλάξεις στην διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* (Sreevatsan *et al.*, 1997). Έχει αναφερθεί ότι μεταλλάξεις στη περιοχή *oxyR-ahpC* όπως οι g-9a και c-15t αυξάνουν την έκφραση του AhrC κατά 9- και 18-φορές, αντίστοιχα (Sherman *et al.*, 1996). Αυτή η αύξηση στην έκφραση του AhrC θεωρείται ότι αντισταθμίζει τη μείωση ή την απώλεια της δραστηριότητας της καταλάσης / υπεροξειδάσης που εμφανίζεται σε στελέχη με αντοχή στην INH, προκειμένου να επιβιώσουν από την τοξικότητα των οργανικών υπεροξειδίων παραγόμενα από τα μακροφάγα του ξενιστή (Sherman *et al.*, 1996, Springer *et al.*, 2001, Ng *et al.*, 2004). Η θεωρία ότι η αύξηση στην έκφραση της AhrC, εξαιτίας μεταλλάξεων στον προαγωγέα του γονιδίου *ahpC*, φαίνεται να είναι περισσότερο μια αντισταθμιστική μετάλλαξη για την μείωση ή την απώλεια δραστηριότητας της καταλάσης - υπεροξειδάσης και όχι ως βάση για την αντοχή σε ισονιαζίδη διαπιστώθηκε και από άλλους ερευνητές (Almeida *et al.*, 2011, Sherman *et al.*, 1996, Rinder *et al.*, 1998; Dookie *et al.*, 2018). Διάφορες μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί στην περιοχή προαγωγέα του γονιδίου *ahpC*, οδηγώντας σε υπερέκφραση αυτής της πρωτεΐνης σε στελέχη με αντοχή στην INH, όπως g-48a, g-51a, c-54t, c-57t, g-74a, c-81t και g-100a (Slayden *et al.*, 2000, Jagielski *et al.*, 2014). Αυτές πάντα συνοδεύονται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* που οδηγούν σε πλήρη απώλεια της δραστηριότητας του KatG (Kelley *et al.*, 1997, Rinder *et al.*, 1998, Dalla Costa *et al.*, 2009). Μεταλλάξεις στην διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* έχουν επίσης εντοπιστεί σε ευαίσθητα στην INH στελέχη *M. tuberculosis*, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι μεταλλάξεις

έχουν μικρή επίδραση στον φαινότυπο αντοχής (Hazbón *et al.*, 2006). Σύμφωνα με τις σημερινές γνώσεις, ο ρόλος του γονιδίου *ahpC* στην αντοχή της INH αποτελεί θέμα συζήτησης και έρευνας.

1.10.4.ε Γονίδιο *mshA*

Η μυκοθειόλη (MSH, N-acetylcysteine glucosamine inositol) είναι η κυρίαρχη θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους στα μυκοβακτήρια, τα οποία δεν παράγουν γλουταθειόνη (GSH) (Newton *et al.*, 1996). Η MSH είναι το λειτουργικό ισοδύναμο της γλουταθειόνης στα μυκοβακτήρια (Newton and Fahey, 2002) και σχετίζεται με την προστασία του *M. tuberculosis* από τοξικά οξειδωτικά και αντιβιοτικά (Buchmeier *et al.*, 2003). Έχει αντιοξειδωτική δράση καθώς και την ικανότητα αποτοξίνωσης μιας ποικιλίας τοξικών ενώσεων (Buchmeier *et al.*, 2003, Newton *et al.*, 2000). Ωστόσο, ο ρόλος της μυκοθειόλης κατά τη διάρκεια της μόλυνσης είναι διφορούμενος, καθώς τα στελέχη του *M. tuberculosis* με έλλειψη μυκοθειολών δεν έχουν μειονέκτημα ανάπτυξης *in vivo* (Vilcheze *et al.*, 2008.) Εξαιτίας αυτών, η MSH είναι υποψήφια για την προστασία του *M. tuberculosis* από αδρανοποίηση από τον ξενιστή κατά τη διάρκεια μολύνσεων καθώς και για την αντοχή των αντιφυματικών φαρμάκων (κυρίως της ισονιαζίδης) (Buchmeier *et al.*, 2003). Η βιοσύνθεση της MSH είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που απαιτούνται πέντε ένζυμα για τη σύνθεση της μυκοθειόλης: MshA, MshA2, MshB (Rv1170), MshC και MshD (Rv0819) (Newton *et al.*, 2008). Σε μια έρευνα για τον προστατευτικό ρόλο της MSH για το *M. tuberculosis*, παρατηρήθηκε ότι η MSH παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση της ισονιαζίδης (Buchmeier *et al.*, 2003). Το γονίδιο *mshA* (Rv0486) (Vilcheze *et al.*, 2008) είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια γλυκοσυλ-τρανσφεράση (MshA) που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της μυκοθειόλης (MSH) και έχει συσχετιστεί περισσότερο με αντοχή στην ισονιαζίδη. Οκτώ *in vitro* μεταλλάξεις *mshA* *M. tuberculosis* απομονώθηκαν που περιείχαν μία μονή τροποποίηση ζεύγους βάσεων στο *mshA*, με αποτέλεσμα αλλαγές αμινοξέων, κωδικονίων τερματισμού και μετατοπίσεων αναγνωστικού πλαισίου, που όλα προκάλεσαν δραστηκή μείωση στα επίπεδα μυκοθειόλης (από 83 έως 99,9%). Οι μεταλλάξεις είχαν διαφορετικά

επίπεδα αντοχής στην INH (2 φορές έως > 10 φορές) (Vilchèze and Jacobs, 2014). Είναι ενδιαφέρον ότι η διαγραφή του *mshA* από το *M. tuberculosis* οδήγησε σε ένα στέλεχος που δεν παρήγαγε μυκοθειόλη, αλλά ήταν πλήρως ευαίσθητο στην INH (Vilcheze *et al.*, 2008). Ο ρόλος της ανεπάρκειας μυκοθειόλης στην αντοχή της INH μπορεί να εξαρτάται από το είδος. Μέχρι στιγμής μπορούμε να συμπεράνουμε ότι στην πλειονότητα τους οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *mshA* θα οδηγήσουν σε χαμηλού επιπέδου αντοχή στην INH στο *M. tuberculosis*. Υψηλή αντοχή σε INH βρέθηκε σε διπλή μετάλλαξη στο γονίδιο *mshA* (V171G, A187V) (Brossier *et al.*, 2011) και ταυτόχρονη μετάλλαξη στο γονίδιο *katG* (S315T). Ωστόσο, οι μεταλλάξεις A187V του γονιδίου *mshA* είναι παρούσα σε στελέχη *M. tuberculosis* ευαίσθητα και ανθεκτικά της οικογένειας Beijing. Άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο *mshA* έχουν επίσης βρεθεί σε ευαίσθητα *M. tuberculosis* στελέχη, όπως η μετάλλαξη N111S σε στελέχη γονοτύπου Haarlem (Vilcheze *et al.*, 2008, Projahn *et al.*, 2011) η G106 σε στελέχη γονοτύπου *M. canettii* και η L244 για τα στελέχη γονοτύπου Tur (Feuerriegel *et al.*, 2014; Projahn *et al.*, 2011).

1.10.4.στ Γονίδιο *nhoA* (ή αλλιώς γονίδιο *nat*)

Στο *M. tuberculosis* Complex, η INH ακετυλιώνεται από το ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση αρυλαμίνης (NAT, Arylamine N-acetyltransferase), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *nat* (*nhoA* / Rv3566c) (Coelho *et al.*, 2011). Το ένζυμο NAT ακετυλιώνει την INH, μεταφέροντας μια ομάδα ακετυλίου από το ακετυλο-συνένζυμο A στο τερματικό άζωτο του φαρμάκου, καθιστώντας την ισονιαζίδη θεραπευτικώς ανενεργή (Sandy *et al.*, 2005). Η χαμηλού επιπέδου αντοχή στην INH στα μυκοβακτήρια και συγκεκριμένα στο *M. tuberculosis* έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του ενζύμου NAT (Ramaswamy *et al.*, 2003, Upton *et al.*, 2001). Ωστόσο, δεν έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *nat* που σχετίζονται με αντοχή στην INH (Payton *et al.*, 1999, Upton *et al.*, 2001). Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις G67R και G207R βρέθηκαν σε ανθεκτικά και σε ευαίσθητα στελέχη στην INH. Έπειτα από βιοχημικές αναλύσεις στην μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Nat που έφερε την μετάλλαξη G207R οδηγήθηκαν στο

συμπέρασμα ότι αυτή είναι σε μεγάλο βαθμό ανίκανη να ακετυλιώσει και κατά συνέπεια να απενεργοποιήσει την INH (Urton *et al.*, 2001). Άλλες μελέτες αναφέρουν ανθεκτικά στελέχη με μετάλλαξη στο γονίδιο *nat* τα οποία έφεραν επίσης υποκατάσταση στο γονίδιο *katG* (Jagielski *et al.*, 2014). Έτσι, δεν υπάρχει προφανής συσχέτιση μεταξύ των μεταλλάξεων στο γονίδιο *nat* και της αντοχής στην INH. Παρόλα αυτά, η διαγραφή του γονιδίου *nat* στο *M. bovis* BCG επηρέασε τη βιοσύνθεση μυκολικών οξέων, γλυκολιπιδίων και σύνθετων λιπιδίων καθώς και την επιβίωση του σε μακροφάγα ποντικών, υποδεικνύοντας ότι το ένζυμο NAT μπορεί να διαμορφώνει άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στην αντοχή στην INH (Bhakta *et al.*, 2004).

1.10.4.ζ Γονίδιο *ndh*

Οι μεταλλάξεις στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό αφορούν το γονίδιο *ndh* (Rv1854c). Πρόκειται για ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια NADH αφυδρογονάση τύπου II, η οποία οξειδώνει το NADH σε NAD⁺ και μεταφέρει ηλεκτρόνια σε κινόνες της αναπνευστικής αλυσίδας κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Bald and Koul, 2010, Lynn *et al.*, 1998, Vilchèze *et al.*, 2014). Ο μηχανισμός αντοχής της INH των μεταλλάξεων του γονιδίου *ndh* βασίζεται πιθανώς στη συσσώρευση ενδοκυτταρικού NADH και μείωση του NAD⁺, εξαιτίας της οξείδωσης του NADH. Ως αποτέλεσμα, το αυξημένο NADH δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας εμποδίζοντας τη σύνδεση INH-NAD στην αναγωγή *InhA* (Vilcheze *et al.*, 2005). Στο *M. tuberculosis*, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ndh* έχουν συσχετιστεί με την αντοχή σε ισονιαζίδη μόνες τους (Cardoso *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2001) ή σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια όπως τα *inhA* και *katG* (Almeida *et al.*, 2011, Cardoso *et al.*, 2007). Παράδειγμα αποτελεί η υποκατάσταση R268H που έχει εντοπιστεί σε δύο ανεξάρτητες μελέτες και μόνο σε στελέχη ανθεκτικά στην INH, αλλά παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *katG*, *inhA* ή *ahpC* (Hazbon *et al.*, 2006). Επιπλέον έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *ndh* τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε στελέχη ανθεκτικά στην INH, όπως η V18A (Hazbon *et al.*, 2006, Ramaswamy *et al.*, 2003, Cardoso *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2001).

1.10.4.η Γονίδια *fbpC*, *fadE24*, *iniB*, *iniA*, *iniC*, *Rv0340*, *efpA*, *Rv1592c*, *Rv1772 fabD*, *kasA*, *accD6*

Όταν το *M. tuberculosis* έρχεται σε επαφή με την INH, πολλά γονίδια υπερεκφράζονται (upregulated), όπως αποδείχτηκε με τη μέθοδο διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιώντας προσαρμοσμένες βιβλιοθήκες ενίσχυσης (DECAL, differential expression using customized amplification library) (Alland *et al.*, 1998). Η διαθεσιμότητα της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) οδήγησε στην ανάπτυξη μικροσυστοιχιών (microarrays) που παρακολουθούσαν την αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση ως απόκριση του *M. tuberculosis* στην INH (Wilson M *et al.*, 1999, Cole *et al.*, 1998). Η μεταγραφική ανάλυση του *M. tuberculosis* μετά από αγωγή με INH αποκάλυψε ότι το *M. tuberculosis* επάγει (upregulated) ένα σύνολο γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται:

1/ στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (γονίδια *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB*, *accD6*)

Τα πέντε γονίδια *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB* και *accD6* είναι οργανωμένα σε ένα οπερόνιο, το FASII, το οποίο προηγείται ενός ρυθμιστικού γονιδίου (ομόλογο *srmR*). Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν ένζυμα της συνθάσης λιπαρών οξέων τύπου II [FAS-II] που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Geistlich *et al.*, 1992, Mdluli *et al.*, 1998, Slayden *et al.*, 2000) δηλαδή του μυκολικού οξέος. Τα γονίδια *fabD* και *acpM* κωδικοποιούν μαλονυλο-συνένζυμο A (CoA):ACP τρανσακετυλάση και πρωτεΐνη ακυλο-μεταφορέα πρωτεΐνη (acyl carrier protein, ACP), αντίστοιχα (Kremer *et al.*, 2001, Wong *et al.*, 2002). Τα γονίδια *kasA* και *kasB* κωδικοποιούν μία συνθάση β-κετοακυλ-ACP, που εμπλέκεται στην παραγωγή μυκολικών οξέων μακράς αλυσίδας (Kremer *et al.*, 2000, Schaeffer *et al.*, 2001). Το τελευταίο γονίδιο του οπερονίου, το *accD6*, είναι μια καρβοξυλάση ακετυλο-συνενζύμου (β-υπομονάδα) που εμπλέκεται στην παραγωγή μαλονυλο-CoA και είναι γνωστό ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του μυκολικού οξέος (Lin *et al.*, 2006, Pawelczyk *et al.*, 2011). Το ομόλογο *srmR* (*srmR* homolog / Rv2422) είναι ένα γονίδιο που βρίσκεται ανοδικά της συστάδας γονιδίων FAS-II και ελέγχει την παραγωγή πολυκετιδίου σε *Streptomyces ambofaciens*. Η βιοσύνθεση των πολυκετιδίων είναι μηχανιστικά παρόμοια με τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων από το σύστημα FAS-II (Geistlich *et al.*, 1992). Εντούτοις, βρέθηκε σε πειράματα μικροσυστοιχίας ότι η έκθεση σε

υψηλές συγκεντρώσεις της INH είχε σαν αποτέλεσμα 2,6 φορές αύξηση στην έκφραση γονιδίου *fabD* (Fu and Shinnick, 2007, Alland *et al.*, 1998). Στο γονίδιο *fabD* βρέθηκαν οι μεταλλάξεις Ser275Asn (AGC→AAC) και Ala199Thr (GCG→ACG) σε ανθεκτικούς και σε ευαίσθητους οργανισμούς (Ramaswamy *et al.*, 2003, Lempens *et al.*, 2018). Επιπλέον, στο γονίδιο *fabD* βρέθηκε η μετάλλαξη A159T στις γενεολογικές γραμμές lineage 1 και lineage 3 στη Νότια Ινδία και οι Ali *et al.* (2015) ανέφεραν την υποκατάσταση Ala3Thr, των οποίων ο ρόλος της στη αντοχή στην INH απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (Manson *et al.*, 2017). Σχετικά με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *kasA* ο ρόλος τους στην αντοχή στην INH παραμένει ασαφής, διότι υπάρχουν μεταλλάξεις (D66N, G269S, G312S, M77I, S341) που βρίσκονται και σε ευαίσθητα στελέχη (Hazbon *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2005, Mdluli *et al.*, 1998, Lempens *et al.*, 2018). Εκτός αυτού, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *kasA* συνήθως παρατηρούνται ταυτόχρονα με μεταλλάξεις στα γονίδια *katG* ή *inhA* σε ανθεκτικά στελέχη (Lee *et al.*, 1999, Ramaswamy *et al.*, 2003, Mdluli *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2005). Στο γονίδιο *accD6* βρέθηκαν μεταλλάξεις (Asp29Gly, Arg204Cys, Glu224Asp) που επίσης έχουν παρατηρηθεί ταυτόχρονα σε ευαίσθητα στελέχη (Lempens *et al.*, 2018, Ramaswamy *et al.*, 2003, Reich *et al.*, 2003). Μια άλλη μελέτη κατέδειξε επίσης την επίδραση της έκθεσης στην INH στην έκφραση του AccD6 (Wilson *et al.*, 1999). Οι Kurth *et al.* (2009) ανέφεραν ότι το AccD6 μπορεί να είναι ένας νέος στόχος στη δημιουργία νέων αντιφυματικών φαρμάκων, εξαιτίας του σημαντικού ρόλου στη σύνθεση του μυκολικού οξέος (Lin *et al.*, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη WGS των Ali *et al.* (2015) έδειξε δύο τύπους υποκαταστάσεων όπως E224D και A243V στο γονίδιο *accD6* σε ανθεκτικά στελέχη οι οποίες όμως συνυπήρχαν με μεταλλαγή στο γονίδιο *katG*. Στο γονίδιο *srmR homolog* έχουν βρεθεί μεταλλάξεις σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη *M. tuberculosis*, όπως η M323T (Lempens *et al.*, 2018, Ramaswamy *et al.*, 2003) ή συνυπάρχουσες με υποκατάσταση στο γονίδιο *katG* σε ανθεκτικά στελέχη, όπως η A156V (Ali *et al.*, 2015).

2/στη δραστικότητα της διμεκολυλης τρανσαλόζης (γονίδιο *fbpC*)

Το γονίδιο *fbpC* είναι ένα άλλο γονίδιο που επάγεται από την INH και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του αντιγόνου 85C που έχει δραστικότητα τρανσαλόζης-διμυκολυλ τρανσφεράσης (trehalose dimycolyl transferase) και μεσολαβεί στα τελικά στάδια σύνθεσης του μυκοβακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, συμβάλλοντας στη διατήρηση

της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος (Belisle *et al.*, 1997). Παρά το γεγονός ότι σε πειράματα μικροσυστοιχίας το γονίδιο *fbpC* βρέθηκε ότι επάγεται κατά την έκθεση στην INH (Fu *et al.*, 2007, Alland *et al.*, 1998.), δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αντοχή σε αυτό (Ramaswamy *et al.*, 2003). Επίσης, παρά τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης FpbC κυττάρων εκτεθειμένων στην INH (Wilson *et al.*, 1999), δεν έχουν ταυτοποιηθούν μεταλλάξεις που σχετίζονται με αντοχή μετά την αλληλούχιση του γονιδίου *fbpC* των κυττάρων αυτών. Μεταλλάξεις ανοδικά της θέσης έναρξης του γονιδίου *fbpC*, όπως οι C-63T και A-23C βρέθηκαν σε ανθεκτικά και σε ευαίσθητα στελέχη (Ramaswamy *et al.*, 2003).

3/ στην αποικοδόμηση λιπαρών οξέων (γονίδιο *fadE24*)

Το γονίδιο *fadE24* κωδικοποιεί μία δεϋδρογονάση του ακυλο-συνενζύμου Α των λιπαρών οξέων (fatty acyl-CoA dehydrogenase), η οποία πιστεύεται ότι αποικοδομεί τα λιπαρά οξέα σε υπομονάδες ακετυλο-CoA με β-οξείδωση (Wilson *et al.*, 1999). Έχουν αναφερθεί οι μεταλλάξεις Ile430Leu, Thr214Ala και μια εισαγωγή 2-bp στη θέση 64 ανοδικά της θέσης έναρξης μετάφρασης του γονιδίου *fadE24* σε ανθεκτικά στελέχη παράλληλα με Ser315Thr στο γονίδιο *katG* (Lempens *et al.*, 2018, Ramaswamy *et al.*, 2003, Ali *et al.*, 2015). Επίσης, μια άλλη υποκατάσταση (A-23C) στο γονίδιο *fadE24* βρέθηκε ταυτόχρονα σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη (Ramaswamy *et al.*, 2003).

4/ στη μεταφορά (γονίδια *iniB*, *iniA*, *iniC*, *Rv0340*)

Η χρωμοσωμική περιοχή *ini* έχει τέσσερα γονίδια που ονομάζονται *Rv0340*, *iniB*, *iniA* και *iniC*, από τα οποία τα τελευταία τρία γονίδια είναι οργανωμένα σε οπερόνιο. Το γονίδιο *Rv0340* βρίσκεται ανοδικά του οπερονίου *iniBAC* και μεταγράφεται με τον ίδιο προσανατολισμό. Τα *ini* γονίδια ταυτοποιήθηκαν αρχικά με βάση την επαγωγή με INH και θεραπεία *in vitro* με αιθαμβουτόλη. Το γονίδιο *iniB* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ασθενή ομολογία με τις δομικές πρωτεΐνες κυτταρικού τοιχώματος πλούσιες σε αλανίνη και γλυκίνη, το γονίδιο *iniA* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ένα μοτίβο θέσης πρόσδεσης φωσφοπανθεινης χαρακτηριστικό των ACP πρωτεϊνών και το γονίδιο *iniC* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία είναι 34 % ταυτόσημη με το IniA (Alland *et al.*, 1998, Alland *et al.*, 2000). Το οπερόνιο κωδικοποιεί έναν μεμβρανικό μεταφορέα, αλλά δεν βρέθηκε να μεταφέρει την INH (Colangeli *et al.*, 2005). Ωστόσο, επάγεται ειδικώς από αντιφυματικά φάρμακα που

αναστέλλουν τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος όπως η INH και η EMB (Alland *et al.*, 1998), άλλα δεν επάγεται από τοξικές καταστάσεις ή συνθήκες στρες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το θερμικό σοκ ή από παράγοντες όπως η λυσοζύμη που αποικοδομεί το κυτταρικό τοίχωμα (Alland *et al.*, 2000). Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι αυτά τα γονίδια είναι είτε λυτικά είτε προστατευτικά (Colangeli *et al.*, 2005). Έχουν περιγραφεί σε όλα τα γονίδια του οπερονίου μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης. Στην περίπτωση του γονιδίου *iniB*, έχουν παρατηρηθεί διαγραφές (π.χ. διαγραφή 12bp από τη δεύτερη βάση του κωδικονίου 222) (Ramaswamy *et al.*, 2003) και ενθέσεις (π.χ. προσθήκη θυμίνης στη θέση νουκλεοτιδίου 198, t198ins) (Zhang *et al.*, 2005) στο γονίδιο *iniA* διαγραφές (διαγραφή 5bp από την τρίτη βάση του κωδικονίου 94, 282-286del και 625delG) (Ramaswamy *et al.*, 2003, Lempens *et al.*, 2018) και στο γονίδιο *iniC* ενθέσεις (t79ins και a98ins) (Zhang *et al.*, 2005). Μεταλλάξεις αντικατάστασης έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *iniA* (His481Gln, Gln394Glu, Gly366Asp, Arg537His, Ser84Arg, Arg562Trp) (Lempens *et al.*, 2018, Zhang *et al.*, 2005), στο γονίδιο *iniB* (Ser385Ile) (Lempens *et al.*, 2018) στο γονίδιο *iniC* (Trp83Gly, Arg476Cys, Tyr185Cys) (Ramaswamy *et al.*, 2003, Lempens *et al.*, 2018) και στο γονίδιο *Rv0340* (Val163Ile) (Lempens *et al.*, 2018) σε ανθεκτικά στελέχη με ταυτόχρονη παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *katG* και/ή *inhA* (Ramaswamy *et al.*, 2003) και κάποιες υποκαταστάσεις (*iniA*: His481Gln, *iniB*: Asp371Thr, *iniC*: Arg476Cys) παρατηρήθηκαν τόσο σε ευαίσθητα στελέχη όσο και σε ανθεκτικά στελέχη (Ramaswamy *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2010).νΩς εκ τούτου οι μεταλλάξεις στο οπερόνιο *iniBAC* μπορεί να έχει μικρό ρόλο μόνο στην αντοχή στην INH.

Να σημειωθεί ότι οι Ramaswamy *et al.* βρήκαν μεταλλάξεις σχετιζόμενες με την αντοχή στην αιθαμβουτόλη και στα τέσσερα αυτά γονίδια. Η ανάλυση αλληλουχίας έδειξε ότι και τα τέσσερα γονίδια φιλοξενούσαν μεταλλάξεις που δεν βρέθηκαν στους ευαίσθητα στελέχη, άλλα εντοπίστηκαν ταυτόχρονα με μεταλλάξεις στα γονίδια *embB* και/ή *ebmA* ή *embC* (Srinivas *et al.*, 2000).

5/ αντλία εκροής (γονίδιο *efpA*)

Το γονίδιο *efpA* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη εκροής, του οποίου ο ρόλος στον μεταβολισμό της INH δεν είναι πλήρως κατανοητός (Wilson *et al.*, 1999). Μεγάλη έρευνα έχει επικεντρωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών των αντλιών εκροής και τη συμβολή

τους στην αντοχή σε INH. Μια μελέτη αξιολόγησε τη σημασία των αντλιών εκροής παρουσία και απουσία των αναστολέων εκροής (EI, efflux inhibitors). Παρατηρήθηκε ότι τα επαγόμενα στελέχη παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα εκροής που μπορούσε να ανασταλεί από τις EI και υπερέκφραση διαφόρων γονιδίων αντλιών εκροής συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *efpA* (Rodrigues *et al.*, 2012). Σε μια άλλη μελέτη (Machado *et al.*, 2012) από την ίδια ομάδα, αποδείχθηκε ότι ευαίσθητα και με μονοαντοχή στην ριφαμπικίνη στελέχη όταν εκτέθηκαν σε κρίσιμες συγκεντρώσεις INH έγιναν ανθεκτικά μετά από τρεις εβδομάδες και ότι στην πλειοψηφία των στελεχών η αντοχή θα μπορούσε να μειωθεί χρησιμοποιώντας EI. Επιπλέον, υποκαταστάσεις στο γονίδιο *efpA* (I73R, T15R) ανιχνεύθηκαν τόσο σε ανθεκτικά στην INH όσο και σε ευαίσθητα στελέχη (Ramaswamy *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2010). Υπάρχει μια εργασία (Zhang, *et al.*, 2005) όπου εντοπίστηκε η υποκατάσταση Glu520Val στο γονίδιο *efpA* μόνο σε ανθεκτικά στελέχη στη INH, υποδηλώνοντας ένα πιθανό ρόλο στην αντοχή στην INH.

6/ σε άγνωστες λειτουργίες (γονίδια *Rv1592c*, *Rv1772*)

Οι ρόλοι των γονιδίων *Rv1592c* και *Rv1772* στη φυσιολογία του *M.tuberculosis* δεν είναι γνωστοί (Cole *et al.*, 1998., Wilson *et al.*, 1999). Όσον αφορά το γονίδιο *Rv1772* έχουν βρεθεί δυο υποκαταστάσεις Thr4Ala και Ile35Thr μόνο σε ανθεκτικά στελέχη, άλλα με παρουσία μετάλλαξης στο γονίδιο *katG* (Ramaswamy *et al.*, 2003). Ομοίως, στο γονίδιο *Rv1592c* έχουν εντοπιστεί οι μεταλλάξεις Pro42Leu, Val430Ala και Gly9Asp με ταυτόχρονη μετάλλαξη στο γονίδιο *katG* και σε άλλα γονίδια (Lempens *et al.*, 2018, Ramaswamy *et al.*, 2003). Οι διπλές μεταλλαγές E321 και I322V στο γονίδιο *Rv1592c* βρέθηκαν τόσο σε ευαίσθητα όσο και ανθεκτικά στελέχη (Ramaswamy *et al.*, 2003). Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για να κατανοηθεί η σημασία των μεταλλάξεων που εντοπίζονται σε αυτά τα γονίδια (Ramaswamy *et al.*, 2003).

Συμπερασματικά, οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα γονίδια που επάγονται ή υπερεκφράζονται παρουσία της INH βρέθηκαν είτε σε ευαίσθητα σε INH στελέχη είτε σε συνδυασμό με άλλες μεταλλάξεις που είναι γνωστό ότι προσδίδουν αντοχή στην INH. Οι ρόλοι τους στην αντοχή INH δεν μπορούν να εκτιμηθούν σε αυτό το σημείο και απαιτούνται αρκετές μελέτες (Vilchèze *et al.*, 2014).

1.10.5 Αντοχή στην ριφαμπικίνη

Η ριφαμπικίνη είναι ένα αντιβιοτικό πρώτης γραμμής για τη θεραπεία της φυματίωσης, αλλά είναι επίσης ένα δραστικό αντιβιοτικό έναντι ενός ευρέως φάσματος βακτηριδίων. Είναι βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό έναντι εξωκυττάρων αλλά και ενδοκυττάρων μικροοργανισμών, ημισυνθετικό προϊόν της ριφαμυκίνης Β που προέρχεται από τον *Streptomyces mediterranei* (Sensi, 1983). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της είναι ότι είναι δραστικό έναντι των ενεργά αναπτυσσόμενων και στατικής φάσης με χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα βακίλων (Mitchison, 1979). Διαχέεται εύκολα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης του *M. tuberculosis* λόγω του λιποφιλικού της προφίλ (Wade and Zhang, 2004).

Η ριφαμπικίνη συνδέεται στην βήτα υπομονάδα της βακτηριακή RNA πολυμεράσης, αναστέλλοντας την έναρξη της σύνθεσης του RNA (Campbell *et al.*, 2001 Blanchard, 1996), οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Η δέσμευση της με υψηλή συγγένεια στην βήτα υπομονάδα της RNA πολυμεράσης πραγματοποιείται μέσω άμεσων και έμμεσων αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα, εμποδίζοντας την μεταγραφή του RNA (Somoskovi *et al.*, 2001).

Η ριφαμπικίνη παράγει σχετικά λίγες ανεπιθύμητες παρενέργειες, κυρίως γαστρεντερικές. Η ηπατοτοξικότητα εμφανίζεται λιγότερο συχνά από ό, τι με τη χορήγηση ισονιαζίδης (Jnawali HN and Ryo S, 2013).

Η πλειοψηφία των κλινικών στελεχών του *M. tuberculosis* με αντοχή στην RIF είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο γονίδιο *rpoB* που κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη διαμόρφωση της β-υπομονάδας που καθορίζουν χαμηλή συγγένεια για τη RIF και συνεπώς την ανάπτυξη αντοχής (Telenti *et al.*, 1993). Ένα σημαντικό εύρημα πολλών ερευνητών είναι ότι σχεδόν όλα τα στελέχη με αντοχή στη ριφαμπικίνη εμφανίζουν ταυτόχρονα αντοχή στην ισονιαζίδα και σπάνια μονοαντοχή στη RIF. Για αυτό το λόγο η ανίχνευση αντοχής στην RIF έχει προταθεί ως υποκατάστατος μοριακός δείκτης για τα MDR-TB στελέχη (Traore *et al.*, 2000).

Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που είναι υπεύθυνες για αντοχή στη RIF έχει χαρτογραφηθεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους, που αναφέρονται ως RIF-cluster I (512-

534), RIF-cluster II (563-574) και RIF-cluster III (687), κοντά στο κέντρο του *rpoB* γονιδίου (Burgess *et al.*, 1987).

Οι μεταλλάξεις στην περιοχή προσδιορισμού αντοχής RIF (RRDR, resistance-determining region) 81 ζευγών βάσης (27 κωδικόνια) του γονιδίου *rpoB*, που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 1276 έως 1356 (κωδικόνια 426 έως 452) στο *Mycobacterium tuberculosis* (Casali *et al.*, 2014, Comas *et al.*, 2012) έχει δειχθεί ότι περιέχει το μεγαλύτερο μέρος των μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στη ριφαμπικίνη (Betts *et al.*, 2002). Οι μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή «θερμού σημείου» 81 bp (hot-spot region) του γονιδίου *rpoB* έχουν βρεθεί περίπου στο 96% των *M.tuberculosis* στελεχών με αντοχή στη RIF (Ramaswamy *et al.*, 1998; Somoskoni *et al.*, 2001; Telenti *et al.*, 1993). Στην βιβλιογραφία, αυτή η περιοχή συναντάται κυρίως σύμφωνα με την αρίθμηση του γονιδίου *rpoB* στο *Escherichia coli* όπου αντιστοιχεί στα κωδικόνια 507-533 ακόμη και όταν οι μεταλλάξεις αναφέρονται στα *M.tuberculosis* στελέχη (Ramaswamy and Musser, 1998, Jin *et al.*, 1988). Οι υποκαταστάσεις αμινοξέος είναι ο πλέον επικρατής τύπος μεταλλάξεων, ακολουθούμενες από διαγραφές και ενθέσεις που εμφανίζονται σε χαμηλές συχνότητες (Nusrath Unissa and Hanna., 2017). Οι συχνότερα αναφερόμενες μεταλλάξεις είναι στα κωδικόνια 521, 526, 531 και 533 (Ramaswamy and Musser, 1998, Somoskoni *et al.*, 2001, Telenti *et al.*, 1993, Somoskoni *et al.*, 2001, Caws *et al.*, 2006) οι οποίες αντιστοιχούν στις θέσεις 440, 445, 450 και 452 στο γονιδίωμα MTB. Οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στα κωδικόνια 531 και 526 κυριαρχούν (65- 86%) στις περισσότερες μελέτες και οδηγούν σε υψηλού επιπέδου αντοχή στη RIF (MIC > 32 mg / L) (Somoskoni *et al.*, 2001). Ωστόσο, οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 511, 514, 516, 518, 522 και 533 έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλού επιπέδου αντοχή στην RIF (Somoskoni *et al.*, 2001, Ohno *et al.*, 1996).

Η θέση των πιο κοινών μεταλλάξεων στην περιοχή 81 bp του γονιδίου *rpoB* επιτρέπει μια προσέγγιση για την ταχεία ανίχνευση αντοχής σε RIF ή / και MDR-TB χρησιμοποιώντας μοριακές μεθόδους. Ωστόσο, μερικές έρευνες δεν ανέφεραν κάποια μετάλλαξη στην περιοχή θερμού σημείου 81 bp, αλλά αντί αυτού βρέθηκαν σπάνιες μεταλλάξεις στην αμινο-τελική περιοχή του *rpoB* γονιδίου (Heep *et al.*, 2000), με πιο σημαντική τη μετάλλαξη στο κωδικόνιο 176 που οδήγησε σε αντοχή υψηλού επιπέδου στη RIF (MIC 1 έως 32 g / ml) (Somoskoni *et al.*, 2001). Ένα μικρό ποσοστό στελεχών με

αντοχή στην RIF (<5%) δεν περιέχει μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpoB*, υποδεικνύοντας εναλλακτικούς μηχανισμούς αντοχής (Musser, 1995). Αρκετές αντλίες εκροής έχουν αναφερθεί ότι παίζουν ρόλο στην αντοχή του RIF σε *M. tuberculosis* (Louw *et al.*, 2009, Gupta *et al.*, 2010.).

1.10.6 Αντοχή στην αιθαμβουτόλη

Η αιθαμβουτόλη (EMB) είναι ένα συνθετικό ειδικό αντιφυματικό φάρμακο χωρίς εμφανή δραστηριότητα έναντι άλλων βακτηρίων. Έχει βακτηριοστατική δράση μόνο έναντι ενεργώς αναπτυσσόμενων βακίλων και δεν έχει επίδραση στους μη πολλαπλασιαζόμενους βακίλους (Takayama *et al.*, 1979). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό αντιμυκοβακτηριδιακό αντιβιοτικό όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμούς αντιφυματικών φαρμάκων για την πρόληψη εμφάνισης αντοχής ή για την θεραπεία της φυματίωσης στην περίπτωση ανθεκτικού στελέχους σε ένα αντιφυματικό (ATS and CDC, 2003). Επιπλέον, ενισχύει την επίδραση άλλων συνοδών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των αμινογλυκοσιδών, των ριφαμυκινών και των κινολόνων (Jnawali and Ryou, 2013). Μεγάλη σημασία έχει σε συνδυασμό με INH και RIF στη θεραπεία της φυματίωσης τόσο σε άτομα με προδιαθεσικούς παράγοντες για ηπατοτοξικότητα, όσο και σε περιπτώσεις όπου οι μικροβιακοί πληθυσμοί δεν είναι εξαιρετικά μεγάλοι. Οι κύριες ανεπιθύμητες παρενέργειες αφορούν την όραση, για αυτό οι ασθενείς πρέπει να ελέγχουν τουλάχιστον μία φορά την οπτική τους οξύτητα και την έγχρωμη όραση (Jnawali and Ryou, 2013).

Η EMB στοχεύει στο μυκοβακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα μέσω αλληλεπίδρασης με τις αραβινοσυλτρανσφεράσες, ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αραβινογαλακτάνης (AG) και λιποαραβινομανάνης (LAM) (Takayama and Kilburn, 1989). Συγκεκριμένα, αναστέλλει τον πολυμερισμό της αραβινάνης του κυτταρικού τοιχώματος (cell wall arabinan) και επάγει τη συσσώρευση της b-D-αραβινοφουρανοσυλ-P-δεκαπρενόλης, ενός ενδιάμεσου στην βιοσύνθεση της αραβινάνης (Wolucka *et al.*, 1994, Zhang and Yew, 2009), οδηγώντας σε έλλειψη υποδοχέων αραβινάνης για τα μυκολικά οξέα (Lee *et al.*, 2005, Telenti *et al.*, 1997, Wolucka *et al.*, 1994) και σε κυτταρικό θάνατο. Η αραβινοσυλτρανσφεράση κωδικοποιείται από το οπερονίο *embCAB*, που περιέχει τα

γονίδια *embC-embA-embB* στο *M.tuberculosis* (Telenti *et al.*, 1997). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η EMB αναστέλλει αρκετές άλλες κυτταρικές οδούς, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού του RNA (Forbes *et al.*, 1962), τη μεταφορά των μυκολικών οξέων στο κυτταρικό τοίχωμα (Takayama *et al.*, 1979) και τη σύνθεση των φωσφολιπιδίων (Cheema and Khuller, 1985).

Αντοχή στην αιθαμβουτόλη το *M.tuberculosis* μπορεί να αναπτύξει σε μικρό χρονικό διάστημα και έχει συσχετιστεί με μεταλλάξεις στο οπερόνιο *embCAB*, κυρίως στο γονίδιο *embB* (Takayama *et al.*, 1989.). Η μετάλλαξη στο κωδικόνιο 306 του γονιδίου *embB* (*embB306*) είναι η πιο διαδεδομένη στις περισσότερες από τις μελέτες και αναφέρεται ως ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός αντοχής μέχρι σήμερα (Telenti *et al.*, 1997, Ramaswamy *et al.*, 2000, *et al.*, 1997). Έχει βρεθεί σε ποσοστό 28%-68% των στελεχών με αντοχή στην EMB και εντοπίζεται σε ένα κυτταροπλασματικό βρόγχο ή θηλιά που σχηματίζει την περιοχή προσδιορισμού αντοχής στην EMB (EMB resistance-determining region, ERDR) (Plinke *et al.*, 2006, Rinder *et al.*, 2001, Sreevatsan *et al.*, 1997, Garg A, Srivastava *et al.*, 2006). Πέντε διαφορετικές μεταλλάξεις αποκαλύφθηκαν στο γονίδιο *embB* στο κωδικόνιο 306, με αποτέλεσμα τρεις διαφορετικές υποκαταστάσεις της μεθειονίνης (Met) σε βαλίνη (Val) ή σε λευκίνη (Leu) ή σε ισολευκίνη (Ile) (Sreevatsan *et al.*, 1997, Ramaswamy *et al.*, 2000).

Έχουν υπάρξει διαφωνίες σχετικά με το ρόλος αυτών των μεταλλάξεων στη αντοχή σε EMB, εξαιτίας του προσδιορισμού των μεταλλάξεων *embB306* σε ευαίσθητα στελέχη (Ahmad *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2004, Mokrousov *et al.*, 2002, Perdigão *et al.*, 2009). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις *embB306* μπορεί να μην προκαλούν αντοχή άλλα να αντιπροσωπεύουν ένα πρώτο βήμα για την ανάπτυξη αντοχής και άλλα γονίδια μπορούν επίσης να εμπλέκονται (Safi *et al.*, 2008, Perdigão *et al.*, 2009). Σε άλλες εργασίες με μεγάλο αριθμό *M. tuberculosis* στελεχών διαπιστώθηκε ότι αυτές δεν συνδέονταν αναγκαστικά με αντοχή στην EMB, αλλά με προδιάθεση και ανάπτυξη αντοχής σε άλλα αντιφυματικά που χορηγούνται σε συνδυασμό (Hazbón, *et al.*, 2005, Safi *et al.*, 2008). Οι ίδιοι παρατήρησαν ότι τα MDR-TB στελέχη είχαν υψηλότερη αναλογία μεταλλάξεων *embB306* από τα ευαίσθητα στελέχη (Hazbón, *et al.*, 2005, Safi *et al.*, 2008). Πειράματα ανταλλαγής αλληλομόρφων (Allelic exchange) έδειξαν ότι ορισμένες μεμονωμένες

μεταλλάξεις που προκαλούν συγκεκριμένες υποκαταστάσεις οδηγούν σε αντοχή στην EMB, ενώ άλλες υποκαταστάσεις είχαν μικρή ή καθόλου επίδραση (Safi *et al.*, 2008), δείχνοντας ότι οι μεταλλάξεις *embB306* προκαλούν αύξηση της MIC της EMB ή μεταβλητά επίπεδα αντοχής στην EMB και ότι είναι απαραίτητες αλλά όχι επαρκείς για την υψηλή αντοχή σε EMB. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη, η οποία διεξήχθη σε στελέχη *M. tuberculosis* διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, ευαίσθητα και ανθεκτικά στην EMB με ή χωρίς MDR, μετά από επανεξέταση σε διαφορούμενα αποτελέσματα, έδειξε τις μεταλλάξεις *embB306* μόνο σε στελέχη με αντοχή. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η συσχέτιση των μεταλλάξεων *embB306* που εντοπίζονται σε ευαίσθητα στελέχη στην EMB μπορεί να σχετίζεται με προβλήματα του φαινοτυπικού τεστ ευαισθησίας (Plinke *et al.*, 2009, Laszlo *et al.*, 2002). Έχει προταθεί και χρησιμοποιούνται οι αντικαταστάσεις *embB306* ως δείκτες ταχείας ανίχνευσης αντοχής στην EMB σε διαγνωστικές μοριακές εξετάσεις (Sreevatsan *et al.*, 1997, Hillemann *et al.*, 2009, Lacoma *et al.*, 2015) και ως ένας υποψήφιο δείκτη για την ταχεία ανίχνευση της MDR και της XDR φυματίωσης (Starks *et al.*, 2009, Damtie *et al.*, 2014) Για τη σωστή θεραπεία των ασθενών με υποψία κυρίως πολυανθεκτικής αντοχής, προτείνεται η ταυτόχρονη χρήση μοριακών και φαινοτυπικών μεθόδων ευαισθησίας στην EMB (Lacoma *et al.*, 2015). Τα αποτελέσματα όλων αυτών των ερευνών καταδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις *embB306* διαδραματίζουν πολύπλοκο αλλά σημαντικό ρόλο στην αντοχή στην EMB. Δυο άλλες συνήθεις μεταλλάξεις είναι οι *embB406* και *embB497*, οι οποίες συνδυαστικά με την *embB306*, ανεβάζουν το ποσοστό των μεταλλάξεων στο γονίδιο *embB* και συγκεκριμένα στην περιοχή ERDR στο 50%-70% (Shi *et al.*, 2011, Telenti *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 2004, Alcaide *et al.*, 1997, Mokrousov *et al.*, 2002, Parsons *et al.*, 2005, Starks *et al.*, 2009, Campbell *et al.*, 2011, Ramaswamy *et al.*, 2000) Γενικά, περίπου το ένα τρίτο των στελεχών με αντοχή στην EMB δεν φέρει μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή (Starks *et al.*, 2009, Ramaswamy *et al.*, 2000) και το 35% των στελεχών δεν έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *embB*, υποδηλώνοντας έναν διαφορετικό μηχανισμό αντοχής (Palomino and Martin, 2014, Palomino, 2011, Alcaide *et al.*, 1997, Zhang *et al.*, 2009).

Μεταλλάξεις στα γονίδια *embC* και *embA* (Srivastava *et al.*, 2009 Ramaswamy *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2015, Jadaun *et al.*, 2009, Goude *et al.*, 2009) συναντώνται λιγότερο συχνά και σε αρκετές περιπτώσεις σε συνδυασμό με πολυμορφισμούς στο γονίδιο *embB*

(Plinke *et al.*, 2010). Σε μια μελέτη του 2018 παρατηρήθηκε ότι τα ανθεκτικά στελέχη στην EMB έφεραν μεταλλάξεις ανοδικά (upstream) του γονιδίου *embA* που αντιστοιχούσαν σε αντοχή EMB υψηλού επιπέδου όταν συνυπάρχουν με τη μετάλλαξη *embB* Met306Ile/ Val (Giri *et al.*, 2018).

Οι Belanger *et al.* (1996) ανέφεραν ότι το *embR* ρυθμίζει το επίπεδο της δραστηριότητας της αραβινοσουλτοτρανσφεράσης *in vitro*, που μπορεί να προσδώσει αντοχή στην EMB (Belanger *et al.*, 1996). Το *embR* μπορεί να ελέγξει τη δραστικότητα της αραβινοσουλτοτρανσφεράσης στο *M. tuberculosis* με τρόπο εξαρτώμενο από τη φωσφορυλίωση (Huang *et al.*, 2005). Έπειτα έχουν αναφερθεί αρκετές μη συνώνυμες μεταλλάξεις στο γονίδιο *embR* σε στελέχη με αντοχή στην EMB (Srivastava *et al.*, 2009, Ramaswamy *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2011, Xu *et al.*, 2015).

Ένας άλλος μηχανισμός αντοχής στην EMB σχετίζεται με το γονίδιο *ubiA* (Rv3806c). Βρέθηκε ότι οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο γονίδιο *ubiA* μαζί με πολύ γνωστές μεταλλάξεις στο γονίδιο *embB* προκαλούν αντοχή υψηλού επιπέδου σε αιθαμβουτόλη (Safi *et al.*, 2013, Xu *et al.*, 2015). Το γονίδιο *ubiA* κωδικοποιεί τη DPPR συνθάση (5-phospho-a-D-ribose-1-diphosphate: decaprenylphosphate 5-phosphoribosyltransferase, DPPR synthase, UbiA), η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του *M. tuberculosis* και εμπλέκεται στη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος (Safi *et al.*, 2013, He *et al.*, 2015). Κάποιες μεταλλαγές στο γονίδιο *ubiA* αναφέρεται επηρεάστηκαν από γεωγραφικές διαφορές και κυριαρχούν στα αφρικανικά στελέχη (Lingaraju *et al.*, 2016, He *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2015, Shamputa *et al.*, 2010, Giri *et al.*, 2018).

Άλλα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων *iniA*, *iniB*, *iniC*, Rv0340, *rmlD*, *rmlA2*, έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται με την αντοχή στην EMB (Ramaswamy *et al.*, 2000), αν και δεν είναι σημαντικά. Το οπερόνιο *iniBAC* κωδικοποιεί έναν μεταφορέα μεμβράνης, αλλά αποδείχθηκε ότι δεν μεταφέρει την INH. Το οπερόνιο επάγεται από αντιφυματικά που αναστέλλουν τη βιοσύνθεση μυκαβακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, όπως η INH και η EMB. Η χρωμοσωμική περιοχή *rmlD* αποτελείται από τρία γονίδια που ορίζονται *rmlD*, *rmbbL* και *rmlA2* που μεταγράφονται στην ίδια κατεύθυνση. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια πιθανολογείται ότι είναι ένζυμα που συμμετέχουν στην τροποποίηση καταλοίπων ραμνόζης πριν από την ενσωμάτωσή τους στο κυτταρικό

τοίχωμα του *M. tuberculosis* και τα οποία ίσως συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις της EMB (Ramaswamy *et al.*, 2000). Περίπου το 25% των ανθεκτικών στελεχών δεν έχουν μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα γονίδια που περιγράφονται, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντοχή στην αιθαμβουτόλη, όπως οι αντλίες εκροής (Louw *et al.*, 2009).

1.10.7 Αντοχή στη πυραζιναμίδη

Η πυραζιναμίδη (PZA), ένα δομικό ανάλογο νικοτιναμίδης, είναι πρώτης γραμμής αντιφυματικό φάρμακο, το οποίο είναι πολύ δραστικό έναντι του *M. tuberculosis*, αλλά όχι άλλων μυκοβακτηριδίων. Η πυραζιναμίδη είναι ενεργή μόνο σε όξινο περιβάλλον (Mcdermott and Tompsett, 1954) και παρουσιάζει δραστικότητα *in vivo*, αλλά όχι *in vitro*. Σπάνια, σκοτώνει μη αναπτυσσόμενους βακίλους με χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα πιο αποτελεσματικά από ό, τι ενεργώς αναπτυσσόμενους βακίλους. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της είναι η ικανότητά της να αναστέλλει τους ημι-αδρανείς βακίλους που βρίσκονται σε όξινο περιβάλλον όπως οι βλάβες της φυματίωσης (Mitchison, 1979). Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με INH και RIF, μειώνει τη διάρκεια της θεραπείας από 1 χρόνο σε 6 μήνες (Grosset, 1978) και είναι ένα από τα βασικότερα αντιφυματικά στη θεραπεία της MDR-TB (Mitchison, 1985). Οι πιο συνηθισμένες παρενέργειες της PZA είναι οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας και γαστρεντερικές διαταραχές (Jnawali and Ryou, 2013).

Η πυραζιναμίδη είναι ένα προφάρμακο που μετατρέπεται σε δραστική μορφή του πυραζινοϊκού οξέος (POA). Ο τρόπος δράσης της πυραζιναμίδης είναι ότι εισέρχεται στο βάκιλο και μετατρέπεται σε πυραζινοϊκό οξύ (POA), με τη δράση του ένζυμο πυραζιναμιδάση / νικοτιναμιδάση, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *pncA* (Konno *et al.*, 1967, Scorpio *et al.*, 1996). Ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει κατανοηθεί πλήρως και έχουν γίνει διάφορες μελέτες, λόγω των ασυνήθιστων ιδιοτήτων της PZA.

Παλιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η πυραζιναμίδη εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο με παθητική διάχυση και μετά τη μετατροπή της σε πυραζινοϊκό οξύ απεκκρίνεται από μία ασθενή αντλία εκροής. Στο *M. tuberculosis*, συσσώρευση ενδοκυτταρικού POA συμβαίνει όταν το εξωκυτταρικό pH είναι όξινο και μετατρέπεται σε

πρωτονιωμένο ΗΡΟΑ. Συγκεκριμένα, υπό όξινες συνθήκες, το ΗΡΟΑ επανααρροφάται και συσσωρεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου (κυτταρόπλασμα) λόγω μιας αναποτελεσματικής αντλίας εκροής, οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη (Zhang and Mitchison, 2003, Salfinger *et al.*, 1990; Somoskovi *et al.*, 2001). Αυτό το αναποτελεσματικό σύστημα εκροής πιστεύεται ότι είναι η αιτία για την μοναδική ευαισθησία του *M. tuberculosis* στην ΡΖΑ, σε αντίθεση με άλλα μυκοβακτηρίδια, όπως *M. smegmatis*, που έχουν ενεργό μηχανισμό εκροής που εξωθεί γρήγορα το ΡΟΑ (Zhang *et al.*, 1999).

Μια άλλη προτεινόμενη θεωρία δηλώνει ότι η συσσώρευση του ΡΟΑ μειώνει το ενδοκυτταρικό ρΗ σε ένα υποβέλτιστο επίπεδο το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε απενεργοποίηση της συνθετάσης λιπαρού οξέος τύπου I (Zimhony *et al.*, 2007) σε πολλαπλασιαζόμενους βακίλους.

Ωστόσο, μεταγενέστερη έρευνα τεκμηρίωσε ότι η δραστηριότητα της ΡΖΑ οφείλεται στη διαταραχή της κινητήριας δύναμης του πρωτονίου (proton motive force), η οποία απαιτείται για τις βασικές λειτουργίες μεμβρανικής μεταφοράς, από το ΡΟΑ σε όξινο ρΗ. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση του ΡΟΑ διαταράσσει το δυναμικό της μεμβράνης, αναστέλλοντας την παραγωγή του ΑΤΡ και τους μεμβρανικούς μεταφορείς στο *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2003), και κατ' επέκταση εμποδίζοντας τη μεμβρανική μεταφορά. Αυτό συσχετίζεται με την αυξημένη δραστηριότητα της ΡΖΑ έναντι των παλαιών ή μη αναπαραγόμενων βακίλων, οι οποίοι έχουν λιγότερο ενεργό μεταβολισμό και λιγότερα αποθέματα ενέργειας καθώς έχουν χαμηλότερο δυναμικό μεμβράνης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αναστολή των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την δημιουργία του δυναμικού της μεμβράνης, όπως πρωτονίου-ΑΤΡάση και ΝΑDΗ αφυδρογονάση, συνεργεί με τη δραστηριότητα της ΡΖΑ. Ένας τέτοιος μηχανισμός δράσης παρέχει την καλύτερη εξήγηση για τις ασυνήθιστες ιδιότητες της ΡΖΑ, όπως η ανάγκη για όξινο ρΗ, η αργή θανάτωση των νέων βακίλων με περισσότερα αποθέματα ενέργειας και η προτίμηση να δρα εναντίον παλαιών ημι-αδρανών βακίλων με λιγότερα αποθέματα ενέργειας.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η 30S ριβοσωμική πρωτεΐνη S1 (RpsA, Rv1630), η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *rpsA* είναι ένας άλλος ζωτικής σημασίας στόχος του ΡΟΑ. Συγκεκριμένα, το πυραζινοϊκό οξύ δεσμεύεται με την 30S ριβοσωμική πρωτεΐνη S1 (RpsA, Rv1630) και αναστέλλει τη μετα-μετάφραση του *M. tuberculosis* (Shi *et al.*, 2011). Η

διαδικασία της μετα-μετάφρασης είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση σπάνιων ριβοσωμάτων σε μη αναπαραγόμενους οργανισμούς (Shi *et al.*, 2011).

Ως ένας άλλος στόχος της PZA αναγνωρίστηκε το γονίδιο *panD*, που κωδικοποιεί το ένζυμο ασπαρτική 1-δεκαρβοξυλάση (*panD*, aspartate 1-decarboxylase) (Zhang *et al.*, 2013), το οποίο μετατρέπει το L-ασπαρτικό σε β-αλανίνη, η οποία με τη σειρά της απαιτείται για τη σύνθεση παντοθενικού και συνενζύμου A (CoA) (Zhang *et al.*, 2013). Είναι γνωστό ότι το CoA έχει κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό και το παντοθενικό είναι σημαντικό για την επιβίωση των *M.tuberculosis* και της παθογένεσης *in vivo* (Sambandamurthy *et al.*, 2002). Προτάθηκε ότι η σύνδεση του POA με το PanD θα μπορούσε να αναστείλει τη σύνθεση του παντοθενικού και του συνενζύμου A, η οποία θα μπορούσε να είναι κρίσιμη για τα ανθεκτικά βακτήρια φυματίωσης (Zhang *et al.*, 2013).

Η απομόνωση του πρώτου ανθεκτικού στελέχους *M.tuberculosis* στην πυραζιναμίδα έδειξε την απουσία δραστηριότητας της πυραζιναμιδάσης σε αυτούς τους οργανισμούς (Konno *et al.*, 1967). Οι μεταλλάξεις στο δομικό γονίδιο (μία περιοχή 561 bp του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης) ή στην περιοχή του προαγωγέα (περιοχή 82 bp) του γονιδίου *pnca* (Scorpio *et al.*, 1996, Juréen *et al.*, 2008, Scorpio *et al.*, 1997) είναι ο κύριος μηχανισμός αντοχής, αφού έχει υπολογιστεί ότι το 72% έως 97% του συνόλου των στελεχών με αντοχή στην PZA παρουσιάζουν μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο (Whitfield *et al.*, 2015). Υπάρχει ένας υψηλός βαθμός ποικιλίας μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένων σημειακών μεταλλάξεων, διαγραφών και ενθέσεων στο γονίδιο *pnca* των ανθεκτικών στελεχών, τα οποία δεν παρουσιάζουν καμία απώλεια προσαρμοστικότητας ή λοιμογόνου δράσης (Dookie *et al.*, 2018, Jureen *et al.*, 2008). Η υψηλή ποικιλομορφία μεταλλάξεων στο γονίδιο *pnca* είναι μοναδική μεταξύ των γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα (Cheng *et al.*, 2000). Η αιτία αυτής της ποικιλίας εξακολουθεί να είναι ασαφής, όμως, πιστεύεται ότι αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε προσαρμοστική μεταλλαξιγένεση ή σε ανεπάρκεια των μηχανισμών επιδιόρθωσης αταίριαστων βάσεων στο DNA ή στο γεγονός ότι το γονίδιο βρίσκεται σε μια περιοχή θερμών σημείων (Mitchison, 1985, Mizrahi and Andersen, 1998, Nusrath Unissa and Hanna, 2017) Ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει την εμφάνιση μερικών στελεχών χωρίς μεταλλαγή στο γονίδιο *pnca*, υποδεικνύοντας ότι η αντοχή θα μπορούσε να οφείλεται σε μεταλλάξεις σε άλλο γενετικό

τόπο (Cheng *et al.*, 2000) ή εναλλακτικούς μηχανισμούς όπως η ανεπαρκής πρόσληψη (Raynaud *et al.*, 1999) και η αυξημένη εκροή. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η δυσκολία στην εκτέλεση του ελέγχου ευαισθησίας για την PZA και ότι αυτά τα στελέχη είναι ψευδώς ανθεκτικά.

Ενδιαφέρον είναι ότι το *M. tuberculosis* είναι μοναδικά ευαίσθητο στην PZA. Η PZA παρουσιάζει μικρή ή καθόλου επίδραση έναντι άλλων μυκοβακτηρίων, που πιθανώς οφείλεται στην υψηλή μεταβλητότητα του *pncA* στα διάφορα είδη μυκοβακτηρίων (Sun *et al.*, 1999). Στην περίπτωση του *M. bovis*, η φυσική υποκατάσταση H57D του γονιδίου *pncA* καθιστά την πυραζιναμίδαση ανενεργή και καθορίζει την ενδογενή αντοχή στην PZA (Scorpio and Zhang, 1996).

Το γονίδιο *rpsA* κατέχει μια πολυσυζητημένη θέση στη βιβλιογραφία, καθώς υπάρχουν πολλαπλές δημοσιεύσεις που υποστηρίζουν και άλλες που απορρίπτουν το ρόλο του γονιδίου στην αντοχή της PZA (Shi *et al.*, 2011, Alexander *et al.*, 2012, Simons *et al.*, 2013, Alexander *et al.*, 2013). Έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *rpsA* προσέδιδε αντοχή στην PZA, επιβεβαιώνοντας ότι το πυραζινοϊκό οξύ δεσμεύεται με αυτή (Shi *et al.*, 2011). Η μελέτη διεξήχθη σε στελέχη με αντοχή στην PZA χωρίς μεταλλάξεις στο γονίδιο *pncA* τα οποία έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpsA*. Ομοίως, μετέπειτα μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpsA* σε μερικά στελέχη με αντοχή στη PZA απουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *pncA* (Shi *et al.*, 2011, Simons *et al.*, 2013, Feuerriegel *et al.*, 2013). Ωστόσο, ο Alexander *et al.* δεν βρήκαν σημαντικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpsA*, υποστηρίζοντας ότι η αλληλούχηση του μπορεί να μην παίζει κάποιο ρόλο στην ανίχνευση της ευαισθησίας σε PZA με μοριακές μεθόδους (Alexander *et al.*, 2012). Έπειτα υπήρξαν αναφορές και από άλλες ερευνητικές ομάδες οι οποίες υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη απόδειξη ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpsA* συνδέονται με αντοχή στην πυραζιναμίδα (Alexander *et al.*, 2012, Simons *et al.*, 2013, Tan *et al.*, 2014). Με βάση τα σημερινά δεδομένα, η συμβολή των μεταλλάξεων του γονιδίου *rpsA* στην αντοχή της πυραζιναμίδης παραμένει περιορισμένη (Alexander *et al.*, 2012, Simons *et al.*, 2013, Tan *et al.*, 2014). Ανεξάρτητα από αυτό, λόγω της χαμηλής επικράτησης, η προγνωστική αξία του γονιδίου *rpsA* ως δείκτη για την αντοχή του PZA τείνει να είναι σχετικά χαμηλή (Ramirez-Busby *et al.*, 2017), ενισχύοντας τη σημαντικότητα του γονιδίου *pncA*.

Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *panD* έχουν συσχετιστεί με αντοχή στην PZA σε *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2014). Η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS, whole genome sequencing) αποκάλυψε την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *panD* σε στελέχη με αντοχή στην PZA και συνιστάται η συμπερίληψη τους στα διαγνωστικά τεστ ανίχνευσης μεταλλάξεων για να ενισχύσει την ανίχνευση της αντοχής (Werngren *et al.*, 2017) Σε μια ξεχωριστή μελέτη που αποσκοπούσε στην κατανόηση της μοριακής βάσης της αντοχής στην PZA αποδείχθηκε ότι διπλές μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο γονίδιο *panD* μειώνουν την συγγένεια σύνδεσης για την PZA (Pandey *et al.*, 2016). Σε μεγάλες αναλύσεις αναφέρθηκε ότι οι μεταλλάξεις του γονίδιο *pncA* και του προαγωγού του παρουσιάζουν ευαισθησία περίπου 90% για μοριακές μεθόδους και η προσθήκη των γονιδίων *rpsA* και *panD* μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία κατά 2% (Ramirez-Busby *et al.*, 2015, Ramirez-Busby *et al.*, 2017). Σε μια μελέτη ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος βρέθηκαν μεταλλάξεις και σε νέα γονίδια σε *M. tuberculosis* στελέχη με αντοχή στην PZA και απουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *pncA*, *rpsA*, *panD*. Τα αποτελέσματα προτείνουν πιθανούς εναλλακτικούς μηχανισμούς αντοχής στο PZA, υποστηρίζοντας ότι η δράση της PZA μπορεί να επηρεάσει πολλαπλούς στόχους (Sheen *et al.*, 2017).

Ο αναγκαίος ρόλος της PZA υπογραμμίζει την ανάγκη για ακριβή και ταχεία ανίχνευση της PZA αντοχής, η οποία είναι πολύ δύσκολη με τα τρέχουσα φαινοτυπικά τεστ ευαισθησίας (Horne *et al.*, 2013). Το τεστ ευαισθησίας (DST) για την πυραζιναμίδα είναι αρκετές φορές τεχνικά αναξιόπιστο λόγω του όξινου pH (5.5), που απαιτείται στην καλλιέργεια. Βάση της αξιοπιστίας των μεταλλάξεων του γονιδίου *pncA* που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, προτείνεται η πρόβλεψη της ευαισθησίας στην PZA να εφαρμόζεται με βάση αυτές τις μεταλλάξεις για να επιτευχθούν βελτιωμένα αποτελέσματα θεραπείας. Η μοριακή ανίχνευση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με την αντοχή στη PZA στο γονίδιο *pncA* είναι πράγματι πιο γρήγορη από τις παραδοσιακές μεθόδους ελέγχου μυκοβακτηριδιακής ευαισθησίας που εξαρτώνται από την ανάπτυξη του *M. tuberculosis* και δοκιμής της δραστηριότητας της πυραζινιδάσης (Zhang and Mitchison, 2003, Chang *et al.*, 2011). Ωστόσο, δεν κυκλοφορούν επί του παρόντος ταχεία εμπορικά μοριακά τεστ για την PZA (Ling *et al.*, 2008). Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ύπαρξης πολλών διαφορετικών

μεταλλάξεων και διασκορπισμένων σε όλο το μήκος των 561 bp του γονιδίου *pncA* και της απουσίας "περιοχής θερμούς σημείου" μεταλλάξεων όπως στη RIF (Zhang *and* Yew, 2009, Singh *et al.*, 2006, Miotto *et al.*, 2014).

1.10.8 Αντοχή στην στρεπτομυκίνη

Η στρεπτομυκίνη (STR) ήταν το πρώτο αποτελεσματικό αντιφυματικό φάρμακο για τη θεραπεία της φυματίωσης και απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό εδάφους *Streptomyces griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008). Ανήκει στις αμινογλυκοσίδες, οι οποίες αποτελούνται από μία ομάδα σακχάρων και μια αμινο-ομάδα. Οι αμινογλυκοσίδες είναι αντιβιοτικά ευρέως φάσματος με βακτηριοκτόνο δράση ενάντια σε μία ποικιλία βακτηριακών ειδών, συμπεριλαμβανομένων των *M. tuberculosis*. Η στρεπτομυκίνη είναι δραστική έναντι αναπτυσσόμενων βακίλλων, αλλά είναι δεν έχει καμία επίδραση μη αναπτυσσόμενων ή ενδοκυττάρων βακίλλων (Mitchison, 1985). Δυστυχώς, εξαιτίας της αρχικής εφαρμογής του φαρμάκου ως μονοθεραπεία κατά της φυματίωσης, εμφάνισε γρήγορα αντοχή (Crofton *and* Mitchison, 1948). Οι σπουδαιότερες παρενέργειες της είναι η ωτοτοξικότητα (ακουστική και αιθουσαία) και η νεφροτοξικότητα, για αυτό οι ασθενείς είναι απαραίτητο να ελέγχουν την ακοή και τη νεφρική λειτουργία κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Jnawali *and* Ryou, 2013). Τα τελευταία χρόνια έχει υποβιβαστεί ως δεύτερης γραμμής αντιφυματικό λόγω των σοβαρών επιπτώσεων και της χαμηλότερης αποτελεσματικότητας της σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιφυματικά. Παρόλα αυτά, συνεχίζει να αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της θεραπείας, συνιστάται σε τυποποιημένα σχήματα για περιπτώσεις υποτροπής και πολυανθεκτικής φυματίωση (όπως προαναφέρθηκε) (WHO, 2017).

Η STR αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση (Ruiz *et al.*, 2002). Προσδένονται μη αντιστρεπτά στην θέση A της 30S υπομονάδας του μυκοβακτηριακού ριβοσωμικού RNA. Ειδικότερα συνδέεται με το 16S rRNA του ριβοσώματος (γονίδιο *rrs*) και τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S12 (γονίδιο *rpsL*), εμποδίζοντας την μεταφορά του πεπτιδυλο-tRNA από τη θέση P στην θέση A (Shen *et al.*, 2007, Finken *et al.*, 1993, Tang *et al.*, 2015). Η τελευταία δεν εκκενώνεται και αποτρέπει τη συνεχή επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας,

αναστέλλοντας τη μετάφραση της πρωτεΐνης (Ruiz *et al.*, 2002, Moazed and Noller, 1987, Ramaswamy and Musser., 1998). Τα ριβοσώματα που συνδέονται με τη στρεπτομυκίνη είναι ανίκανα να ξεκινήσουν και να επιμηκυνθούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γονιδιακής μετάφρασης. Η στρεπτομυκίνη αποτρέπει επίσης την αποσύνθεση των ριβοσωμικών 50S και 30S υπομονάδων (Cooksey *et al.*, 1996, Perdigão *et al.*, 2014). Σε αντίθεση με άλλα βακτήρια που έχουν πολλαπλά αντίγραφα rRNA γονιδίων, τα μέλη του *M. tuberculosis* Complex έχουν μόνο ένα αντίγραφο, το οποίο σημαίνει ότι οι αλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε αντοχή στην στρεπτομυκίνη (Bercovier *et al.*, 1986).

Ο κύριος μηχανισμός αντοχής στη STR πιστεύεται ότι προκαλείται μέσω μεταλλάξεων στα γονίδια *rpsL* και *rrs* (Gillespie, 2002, Finken *et al.*, 1993). Περίπου το 60% -70% των ανθεκτικά κλινικών στελεχών έχουν μια μετάλλαξη σε ένα από αυτά τα δύο γονίδια *rrs* και *rpsL*, που κωδικοποιούν το 16S rRNA και τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S12, αντίστοιχα (Douglass and Steyn, 1993, Meier *et al.*, 1996, Gillespie, 2002, Damtie *et al.*, 2014), προκαλώντας μεταβολές στη θέση δέσμευσης της πρωτεΐνης. Αποτέλεσμα αυτού είναι ενδιάμεσο ή υψηλό επίπεδο αντοχής στη στρεπτομυκίνη.

Η πλειοψηφία των σημειακών μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα αντοχής στη STR συμβαίνουν στο γονίδιο *rpsL*, με πιο κοινή την μετάλλαξη K43R (υποκατάσταση της λυσίνης (K) από αργινίνη (R) στο κωδικόνιο 43) η οποία οδηγεί σε υψηλού επιπέδου αντοχή (Palomino and Martin, 2014, Ramaswamy and Musser, 1998, Honore and Cole, 1994, Nair *et al.*, 1993). Η υποκατάσταση K88R συνήθως παίζει δευτερεύοντα ρόλο και συμβαίνει λιγότερο συχνά από την αλλαγή K43R (Jagielski *et al.*, 2014). Ελάχιστες μελέτες αναφέρουν τις δυο υποκαταστάσεις εξίσου στα στελέχη με STR αντοχή (Meier *et al.*, 1996, Abbadi *et al.*, 2009, Tudo *et al.*, 2010). Μια σημαντική παρατήρηση πολλών ερευνητών ήταν η μεταλλαγή εμφανίστηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα σε περιοχές όπου επικρατούσαν στελέχη γονοτύπου Beijing (Jagielski *et al.*, 2014).

Στο γονίδιο *rrs*, οι μεταλλάξεις εντοπίζονται συχνότερα στις περιοχές των θηλιών 530 και 912 (Okamoto *et al.*, 2007, Spies *et al.*, 2011, Hlaing *et al.*, 2017, Palomino and Martin, 2014). Στα μοντέλα δευτερογενούς δομής, ο βρόχος 530 του 16S rRNA είναι εξαιρετικά συντηρημένος και βρίσκεται δίπλα στην περιοχή 915. Πολλά νουκλεοτίδια και

των δύο αυτών περιοχών αλληλεπιδρούν με τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S12 (Stern *et al.*, 1988). Προηγούμενες μελέτες στο *E. coli* έδειξαν ότι το STR αλληλεπιδρά άμεσα με τον βρόχο 530 και την περιοχή 915 του 16S rRNA, ενισχύοντας την άποψη ότι μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις οδηγούν σε αντοχή στην STR (Moazed and Noller, 1987).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpsL* έχουν συσχετιστεί με υψηλό επίπεδο αντοχής STR, ενώ οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *rrs* έχουν αποδειχθεί ότι προσδίδουν ενδιάμεσο ή χαμηλό επίπεδο αντοχής [Cooksey *et al.*, 1996, Meier *et al.*, 1996, Abbadi *et al.*, 2009, Tudo *et al.*, 2010, Nhu *et al.*, 2012]. Πολύ σπάνια έχουν παρατηρηθεί στελέχη με μεταλλάξεις ταυτόχρονα και στους δύο αυτούς τύπους (Meier *et al.*, 1996, Sreevatsan *et al.*, 1996, Cuevas-Córdoba *et al.*, 2013, Sun *et al.*, 2010). Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις σε ένα από τα δυο γονίδια μπορεί να μειώσουν την ανάγκη για τροποποίηση του άλλου γονιδίου (Jagielski *et al.*, 2014).

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *gidB*, το οποίο κωδικοποιεί μια συντηρημένη μεθυλοτρανσφεράση 7-μεθυλογουανοσίνης (m7G, 7-methylguanosine methyltransferase) ειδική για τη μεθυλίωση του G527 στο βρόχο του 16S rRNA, εμπλέκονται στην αντοχή της STR στο *M. tuberculosis* (Wong *et al.*, 2011, Okamoto *et al.*, 2007, Spies *et al.*, 2008, Verma *et al.*, 2014, Jagielski *et al.*, 2014). Αυτές έχουν θεωρηθεί ως εναλλακτικός μηχανισμός για αντίσταση σε στρεπτομυκίνη (Silva *et al.*, 2001). Δεδομένου ότι η σύνδεση της STR με το 16S rRNA είναι κρίσιμη για τον μηχανισμό δράσης της, οι μεταλλάξεις στο *gidB* μπορεί να είναι υπεύθυνες και να εξηγήσουν την χαμηλού επιπέδου αντοχή στην STR όταν δεν υπάρχει μετάλλαξη στα γονίδια *rpsL* ή *rrs* (Perdigão *et al.*, 2014). Οι πολυμορφισμοί *gidB* μπορεί να προσδώσουν ένα χαμηλού επιπέδου αντοχής στη στρεπτομυκίνη (Wong *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2000, Okamoto *et al.*, 2007, Spies *et al.*, 2008, Verma *et al.*, 2014, Jagielski *et al.*, 2014). Ωστόσο, η συσχέτιση ορισμένων μεταλλάξεων στο *gidB* με αντοχή στην STR χρήζει περαιτέρω διερεύνηση, καθώς υποκαταστάσεις βρίσκονται επίσης σε ευαίσθητα στελέχη (Sekiguchi *et al.*, 2007).

Υπάρχουν πολυμορφισμοί που δεν εμπλέκεται με αντοχή στην STR (Spies *et al.*, 2008), άλλα σχετίζονται με στελέχη συγκεκριμένης φυλογενετικής οικογένειας (Zhao *et al.*, 2015, Smittipat *et al.*, 2016). Παράδειγμα αποτελεί η διπλή μεταλλαγή E92D/A205 που έχει συσχετιστεί με Beijing στελέχη (Feuerriegel *et al.*, 2012). Η εξαιρετικά πολυμορφική φύση

του γονιδίου *gidB* έχει παρατηρηθεί σχεδόν σε από όλους τους συγγραφείς. Παγκοσμίως, περίπου το 30% των στελεχών με STR αντοχή δεν φέρει καμία μετάλλαξη στα τρία αυτά γονίδια και ως εκ τούτου έχουν προταθεί πρόσθετοι μηχανισμούς αντοχής όπως η αντλία εκροής αμινογλυκοσίδης Tap (Rv1258c) και ο μεταγραφικός ρυθμιστής της, *whiB7* (Rv3197A) (Spies *et al.*, 2008, Morris *et al.*, 2005, Reeves *et al.*, 2013, Villellas *et al.*, 2013, Silva *et al.*, 2001).

1.11 Γενεολογίες των *M. tuberculosis* Complex

1.11.1 Εξέλιξη των *M. tuberculosis* Complex

Η ανακάλυψη των μοριακών τεχνικών και κατ' επέκταση η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS. whole genome sequencing) παρείχαν στους ερευνητές τη δυνατότητα για έρευνα σε βάθος επεκτείνοντας τη γνώση της βιολογίας του *M. tuberculosis* και της γενετικής ποικιλομορφίας των MTBC.

Μια σειρά φυλογενετικών μελετών πραγματοποιήθηκε με στόχο την κατανόηση της φυλογενετικής δομής των MTBC, της κατανόηση της παγκόσμιας κατανομής των MTBC και της εξέλιξης της αρχαίας ασθένειας, τη φυματίωση. Οι Brosch *et al.* (2002) βασιζόμενοι στην παρουσία ή απουσία της ειδικής διαγραφής TbD1 του *M.tuberculosis*, χώρισαν τα μέλη του MTBC σε «μοντέρνα» (modern) και σε «αρχαία» (ancient), αντίστοιχα (Brosch *et al.*, 2002). Με τη χρήση των πολυμορφισμών μεγάλων αλληλουχιών (LSPs, large sequence polymorphisms), οι οποίοι είναι φυλογενετικοί δείκτες, οι Gagneux *et al.* (2006) διαπίστωσαν ότι τα προσαρμοσμένα στον άνθρωπο (human-adapted) MTBC αποτελούνται από έξι κύριες γενεολογίες (lineages) που δείχνουν βιογεωγραφική εξειδίκευση ή προτίμηση, δηλαδή σχετίζονται με συγκεκριμένες γεωγραφικές τοποθεσίες και τους αντίστοιχους πληθυσμούς (Gagneux *et al.*, 2006). Με τους ίδιους φυλογενετικούς δείκτες (LSPs), οι Hershberg *et al.* (2008) έδειξαν ότι όλα τα προσαρμοσμένα σε ζώα μέλη MTBC (animal-adapted) αποτελούν μια ομάδα και επιβεβαίωσαν την κατηγοριοποίηση σε αρχαία και μοντέρνα προσαρμοσμένα στον άνθρωπο μέλη MTBC βάση της TbD1. Το 2013

American) και 7 (Ethiopia). Οι δυο γενεολογικές γραμμές του *M. africanum* είναι η γενεολογική γραμμή 5 (*M. africanum* 1, West Africa) και η 6 (*M. africanum* 2, West Africa). Οι γενεολογικές γραμμές 1, 5 και 6 ορίζονται ως αρχαίες, οι 2, 3 4 ως σύγχρονες και η 7 φαίνεται να είναι μεταξύ των αρχαίων και σύγχρονων (Galagan *et al.*, 2014, Gagneux *et al.*, 2006). Κάποια από τα είδη που ανήκουν στη γενεολογία προσαρμοσμένη στα ζώα είναι τα *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, η οποία πήρε το όνομα του πιο διαδεδομένου είδους στον άνθρωπο (*M. bovis*) (Smith *et al.*, 2006, Alexander *et al.*, 2010, Galagan *et al.*, 2014).

Η πιο πρόσφατη θεωρία υποστηρίζει ότι ένας κλώνος *M. tuberculosis*, που αρχικά προσαρμόστηκε για να προκαλέσει την ανθρώπινη φυματίωση εξελίχθηκε (*M. bovis*) ώστε να μολύνει θηλαστικά και εξαπλώθηκε σε οικόσιτα ζώα, ακυρώνοντας τη παλιότερη θεωρία ότι η φυματίωση προήλθε από τα ζώα κατά την εξημέρωση τους (Galagan *et al.*, 2014). Ο κλώνος αυτός είναι ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος του υπάρχοντος *M. tuberculosis*, εμφανίστηκε στην Αφρική, από όπου ξεκίνησε η διασπορά και η ανάδυση των διαφόρων γενεολογιών. Έχουν γίνει αρκετές μελέτες και υπάρχουν αρκετές θεωρίες για την χρονική προέλευση και την παγκόσμια διασπορά των διαφόρων γενεολογιών του *Mycobacterium*. Η αρχική συσχέτιση αυτών με τις μεταναστεύσεις ανθρώπων εκτός Αφρικής (Out of Africa) δεν συνέπιπτε με τις εκτιμήσεις του ρυθμού εξέλιξης του *M. tuberculosis* βάση μιας ποικιλίας μεθόδων βαθμονόμησης (Comas *et al.*, 2013, Galagan *et al.*, 2014, Brynildsrud *et al.*, 2018, Menardo *et al.*, 2019). Νεότερες θεωρίες τείνουν να συσχετίσουν σημαντικά ιστορικά γεγονότα με την εξάπλωση της νόσου (O'Neill *et al.*, 2019, Wiens *et al.*, 2018). Οι σύγχρονες γενεολογίες είναι οι πιο διαδεδομένες παγκοσμίως (Glynn *et al.*, 2002, Demay *et al.*, 2012, Mathema *et al.*, 2006, Hershberg *et al.*, 2008).

1.11.2 Παγκόσμια διασπορά των γενεολογιών *M. tuberculosis*

Βάση των όσων προαναφέρθηκαν οι φυλογενετικές αναλύσεις πρότειναν ότι οι γενεολογίες *M. tuberculosis* έχουν προσαρμοσθεί στους διαφορετικούς ανθρώπινους πληθυσμούς. Πράγματι, οι γενεολογίες συνδέονται στενά με γεωγραφικές περιοχές και τα

ονόματά τους αντικατοπτρίζουν τη γεωγραφική προέλευση του πληθυσμού *M. tuberculosis*.

Η γενεολογία 1 (Indian Ocean) έχει αναφερθεί στην Ανατολική Αφρική, σε όλο τον Ινδικό Ωκεανό, στη Νοτιοανατολική και Νότια Ασία. Σε χαμηλότερη συχνότητα έχει απομονωθεί στην Βόρεια Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή, την Κεντρική Ασία και στην Ωκεανία (Demay *et al.*, 2012 , Brudey *et al.*, 2006). Σε αυτή τη γενεολογική γραμμή ανήκει η οικογένεια EAI (Brites and Gagneux, 2015, Firdessa *et al.*, 2014).

Η γενεολογική γραμμή 2 (East-Asian) είναι μία από τις πιο μολυσματικές γενεολογίες του *M. tuberculosis* και εξαπλώνεται σε όλο τον κόσμο (Demay *et al.*, 2012 , Brudey *et al.*, 2006). Σε αυτή ανήκει κυρίως η οικογένεια Beijing, που είναι κυριαρχεί στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία και στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης (Demay *et al.*, 2012 , Brudey *et al.*, 2006, Brites and Gagneux, 2015, Firdessa *et al.*, 2014), με το υψηλότερο ποσοστό να εντοπίζεται στην περιοχή του Πεκίνου της Κίνας (Qian *et al.*, 1999). Η γενεολογία 2 εμφανίζεται σε υψηλό ποσοστό στην Ωκεανία, στην Αφρική (εκτός της Δύσης) και στη Βόρεια Αμερική, ενώ λιγότερο στις άλλες περιοχές του κόσμου, όπως τη Βόρεια Ευρώπη, την Ινδία, την Κεντρική και Νότια Αμερική και τη Μέση Ανατολή (Demay *et al.*, 2012 , Brudey *et al.*, 2006, Mathema *et al.*, 2006, Hershberg *et al.*, 2008).

Η γενεολογική γραμμή 3 (East-African-Indian) εντοπίζεται κυρίως στη Νότια και Δυτική Ασία (Demay *et al.*, 2012 , Brudey *et al.*, 2006). Σε υψηλότερη συχνότητα βρίσκεται επίσης στην Ανατολική Αφρική και Ινδία, ενώ σε χαμηλότερη συχνότητα σε άλλες περιοχές, όπως η Κεντρική και Βόρεια Αμερική, η Ευρώπη, η Άπω Ανατολή, η Ασία και η Ωκεανία (Brites and Gagneux, 2015, Firdessa *et al.*, 2014, Mathema *et al.*, 2006, Hershberg *et al.*, 2008). Σε αυτή τη γενεολογική γραμμή ανήκει η οικογένεια CAS/Delhi η οποία επικρατεί στην Ινδία, το Ιράν και το Πακιστάν (> 50%) (Demay *et al.*, 2012 , Brudey *et al.*, 2006).

Η γενεολογική γραμμή 4 (Euro-American) αποτελείται από 10 διαφορετικές οικογένειες, στις οποίες οι 5 κύριες και ευρέως διαδεδομένες σε ολόκληρο τον κόσμο είναι οι Haarlem, LAM, T, X-type και S-type (Demay *et al.*, 2012 , Brudey *et al.*, 2006). Αυτή η γενεολογική γραμμή είναι η πιο συχνή στην Ευρώπη και την Αμερική, αλλά κυριαρχεί επίσης στη Βόρεια Αφρική, τη Μέση Ανατολή και την Ωκεανία (Comas *et al.*, 2013, Demay

et al., 2012, Brudey *et al.*, 2006, Brites and Gagneux, 2015, Firdessa *et al.*, 2014). Ωστόσο, η κατανομή ειδικών οικογενειών ποικίλλει ανάλογα με τις περιοχές. Η οικογένεια Haarlem είναι η πιο συχνή οικογένεια και κυριαρχεί στην Ευρώπη και στην Αμερική. Η οικογένεια LAM εντοπίζεται κυρίως στην Αμερική, στην Ωκεανία και σε όλες τις υποπεριφέρειες της Αφρικής. Η οικογένεια S βρίσκεται στην Βόρεια Αφρική και στη Νότια Ευρώπη, η οικογένεια T σε όλες τις ηπείρους και η οικογένεια X κυριαρχεί στην Βόρεια Αμερική (Demay *et al.*, 2012, Brudey *et al.*, 2006).

Οι γενεαλογικές γραμμές 5 και 6 (*M. africanum* 1 & 2) βρέθηκαν αποκλειστικά στη Δυτική Αφρική, ενώ η γενεαλογική γραμμή 7 εντοπίζεται κυρίως στην Αιθιοπία (Brites and Gagneux, 2015, Firdessa *et al.*, 2014).

1.11.3 Παθογονικότητα-μολυσματικότητα και ποικιλότητα των MTBC

Έχει βρεθεί ότι η μολυσματικότητα και η παθογονικότητα μπορεί να εξαρτάται από το γονότυπο ή την οικογένεια του μολυσματικού MTBC στελέχους (Lopez *et al.*, 2003). Η χρήση των μεθόδων γονοτύπησης βοηθάει στην εξερεύνηση της εξάπλωσης της ποικιλότητας του MTBC, των διακυμάνσεων μεταξύ των στελεχών, τη συσχέτιση τους με την ανοχή στα αντιφυματικά φάρμακα και με την έκβαση της νόσου. Επιπλέον, συνέβαλε στη συσχέτιση των γονοτύπων με τον παθογόνο πληθυσμό και των αντίστοιχων κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ασθενών με φυματίωση (Coscolla and Gagneux, 2010).

Η σοβαρότητα και η διάρκεια της νόσου έχει συσχετισθεί με γενεολογίες του MTBC σε πολλές μελέτες (Caws *et al.*, 2008, Thwaites *et al.*, 2008, Arora *et al.*, 2009). Έχει αναφερθεί ότι οι μολύνσεις από διάφορες γενεολογίες MTBC εμφανίζουν διαφορετικό κλινικό φαινότυπο (Coscolla and Gagneux, 2014). Σε μια μελέτη του 2010 εξετάστηκαν οι φαινοτυπικές συνέπειες της γενετικής ποικιλομορφίας και βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των στελεχών σχετικά με την τοξικότητα, ανοσογονικότητα και την έκβαση της νόσου. Αποδείχθηκε ότι η εξέλιξη της νόσου ήταν λιγότερο πιθανή στους ασθενείς που έχουν μολυνθεί με *M africanum* συγκριτικά με *M. tuberculosis* (de Jong *et al.*, 2008, Ribeiro *et al.*, 2014). Για παράδειγμα, η γενεαλογία 4 (Euro-American) σχετίζεται με πνευμονική φυματίωση (Caws *et al.*, 2008), τα στελέχη του Beijing σχετίζονται με σοβαρή παθολογία

των πνευμόνων (Kato-Maeda *et al.*, 2012), τα στελέχη της EAI προκαλούν μια λιγότερο σοβαρή πνευμονική νόσο (Albanna *et al.*, 2008) και τα στελέχη CAS είναι πιο διαδεδομένα εξωπνευμονική φυματίωση (Wamala *et al.*, 2015, Sankar *et al.*, 2013).

Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η επικράτηση ενός MTBC γονότυπου μπορεί να έχει βιολογικά πλεονεκτήματα σε συγκεκριμένους ξενιστές πληθυσμούς, και τέτοια ευρήματα μπορούν να βοηθήσουν την κατανόησή όσον αφορά τους ξενιστές και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, καθώς και τα χαρακτηριστικά του παθογόνου που καθορίζουν την έκβαση της φυματίωσης. Οι γενεαλογίες 2 και 4 είναι οι πιο διαδεδομένες γεωγραφικά και οι πιο μολυσματικές (Coscolla and Gagneux, 2014), αποδεικνύοντας ότι οι σύγχρονες γενεολογίες παρουσιάζουν εξελικτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις αρχαίες. Πιθανώς έχουν αναπτύξει ρυθμιστικά συστήματα σε βάρος της ανοσίας του ξενιστή που τους επιτρέπουν την επιβίωση τους σε αυτόν. Συγκεκριμένα, η οικογένεια του Beijing έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με νέους σε ηλικία ασθενείς, υψηλή λοιμογόνο δράση, αποτυχία προστασίας του εμβολίου BCG, αντοχή στα φάρμακα και MDR, υποτροπές και αποτυχίες θεραπείας σε πολλές χώρες του κόσμου (Glynn *et al.*, 2002, Tounghousova *et al.*, 2002, Wada *et al.*, 2009, Parwati *et al.*, 2010, Ordway *et al.*, 2011, Kato-Maeda *et al.*, 2012, Pang *et al.*, 2012). Αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν προκαλέσει συζητήσεις σχετικά με την προσαρμοστικότητα τέτοιων στελεχών. Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις που οδηγούν σε μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα των στελεχών του Πεκίνου στις συνθήκες στρες και στη δυνατότητα αυξημένης ικανότητας εξάπλωσης στελεχών (Kruuner *et al.*, 2001, Ebrahimi-Rad *et al.*, 2003). Πειράματα έχουν δείξει υψηλή μολυσματικότητα (Manca *et al.*, 2005, Tsenova *et al.*, 2005) συγκριτικά κάποια στελέχη της γενεολογίας 4 (Coscolla and Gagneux, 2010). Στο γονότυπος Haarlem έχει αναφερθεί η παρουσία παρόμοιων χαρακτηριστικών προσαρμοστικότητας με αυτά των Beijing, (Parwati *et al.*, 2010) ως αιτία της ανθεκτικής φυματίωσης (Mardassi *et al.*, 2005) και υψηλής μεταδοτικότητας. Αντιθέτως, τα στελέχη της οικογένειας EAI συσχετίστηκαν με ηλικιωμένο πληθυσμό, χαμηλότερα ποσοστά μετάδοσης της φυματίωσης και με χαμηλότερη μολυσματικότητα (Albanna *et al.*, 2008, Nguyen *et al.*, 2012). Μελέτες έχουν αναφερθεί στην διαφορά της μολυσματικότητας και της παθογονικότητας ακόμη και σε στελέχη της ίδιας οικογένειας, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπο-γενεολογίες (sub-

lineage) των γενεολογιών 3 και 4 μπορεί να προκαλέσουν σοβαρή νόσο (Newton *et al.*, 2006, Wamprande *et al.*, 2019). Περαιτέρω μελέτη είναι αναγκαία για την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη μεταδοτικότητα και μολυσματικότητα τέτοιων οικογενειών (Parwati *et al.*, 2010)

Παρά τις προαναφερθέντες μελέτες παραμένει περιορισμένο το γνωστικό μας πεδίο σχετικά σχετικά με την αλληλεπίδραση του ανθρώπου και της γενετικής ποικιλότητας του MTBC. Είναι σημαντική η κατανόηση της φύσης της συν-εξέλιξης του *M. tuberculosis* και του ανθρώπου, του χρονικού διαστήματος κατά το οποίο αυτό έχει συμβεί, της φύσης της παθογένειας του *M. tuberculosis*, για την ανάπτυξη φαρμάκων και εμβολίων. Επιπλέον, θα βοηθήσουν στην κατανόηση της πιο πρόσφατης εξελικτικής προσαρμογής του *M. tuberculosis* που είναι η εμφάνιση αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα και εν συνεχεία στον καλύτερο έλεγχο της φυματίωσης σε παγκόσμιο επίπεδο (Ernst, 2012, Young *et al.*, 2009, Comas and Gagneux, 2009, Young and Verreck, 2012). Να τονιστεί η απουσία συσχέτισης συγκεκριμένων μεταλλάξεων με συγκεκριμένες γενεολογίες (Yuan *et al.*, 2015, Zhou *et al.*, 2017).

Σε αρκετές εργασίας έχει βρεθεί ότι οι διάφορες γενεολογίες MTBC εμφανίζουν φαινοτυπικές διαφορές όσον αφορά την ενδοκυτταρική επιβίωση και το μεταγραφικό προφίλ σε μακροφάγους (Homolka *et al.*, 2010, Portevin *et al.*, 2011, Sarkar *et al.*, 2012). Επίσης έχει βρεθεί ότι η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή η οποία αρχίζει από τη στιγμή της μόλυνσης είναι διαφορετική. Π.χ. στελέχη Beijing έχουν αυξημένη ικανότητα να αναστέλλουν την προστατευτική ανοσία προκαλώντας ισχυρότερη απόκριση ρυθμιστικών κυττάρων Τα απάντηση των T ρυθμιστικών κύτταρων (regulatory T-cell response) (Boom *et al.*, 2003, Sahiratmadja *et al.*, 2007, Fletcher *et al.*, 2016, Petruccioli *et al.*, 2016, Romagnoli *et al.*, 2018, Tram *et al.*, 2018).

1.12 Μοριακή επιδημιολογία της φυματίωσης

Η αναζωπύρωση της φυματίωσης σε παγκόσμιο επίπεδο έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την κατανόηση της επιδημιολογίας και την παθογένεια της νόσου. Η

μοριακή επιδημιολογία είναι ένας κλάδος επιδημιολογίας που αναπτύχθηκε με τη συγχώνευση της μοριακής βιολογίας σε επιδημιολογικές μελέτες, επιτρέποντας στους επιδημιολόγους τη διεξαγωγή ευρείας κλίμακας επιδημιολογικών μελετών σε μοριακό επίπεδο (Eybroosh *et al.*, 2017). Εφαρμόζεται στην έρευνα των μολυσματικών ασθενειών και παρέχει τη δυνατότητα καλύτερη κατανόησης της προέλευσης των ασθενειών, την παθογένεια, τη λοιμογόνο δύναμη, την μετάδοση και την έκβαση της νόσου. Οι σύγχρονες μοριακές επιδημιολογικές μέθοδοι είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τον έλεγχο εξάπλωσης ορισμένων στελεχών του *M. tuberculosis*, την ανακάλυψη του μηχανισμού μετάδοσης, την γενική επιτήρηση και κατανόηση της φυματίωσης.

Οι μέθοδοι γονοτύπησης είναι το βασικό εργαλείο για τις μοριακές επιδημιολογικές έρευνες της φυματίωσης. Η γονοτύπηση (genotyping) (ή αλλιώς γενετικό αποτύπωμα) κατέστη δυνατή με την ανακάλυψη διαφόρων γενετικών δεικτών στις αρχές της δεκαετίας του '90 και έχει αντικαταστήσει τους φαινοτυπικούς δείκτες (Jones and Greenberg, 1978) ως η κύρια μέθοδος για τη διαφοροποίηση στελεχών του *M. tuberculosis*. Τα στελέχη που έχουν τον ίδιο γονότυπο αποτελούν μια ομάδα (cluster) και υποτίθεται ότι προέρχονται από ένα μόνο πρόγονο (Kato-Maeda *et al.*, 2011). Η γονοτύπηση των στελεχών του *M. tuberculosis* παίζει βασικό ρόλο ή είναι χρήσιμη στον εντοπισμό της πηγής μόλυνσης, την δυναμική ανάλυση του πληθυσμού και τον προσδιορισμό των κρουσμάτων (Djelouadji *et al.*, 2008).

Οι γονότυποι του *M. tuberculosis* μπορούν να ληφθούν από διάφορες μεθόδους προσδιορίζοντας ειδικούς γενετικούς δείκτες. Οι γενετικοί δείκτες αυτοί θα πρέπει να είναι αρκετά πολυμορφικοί και ικανοί να διακρίνουν τα συγγενικά στελέχη από τα μη συγγενικά με μεγάλη αξιοπιστία (Kato-Maeda *et al.*, 2011). Πολλές από τις αρχικές μελέτες επικεντρώθηκαν στην αξιολόγηση γενετικών δεικτών για τον προσδιορισμό της σταθερότητας τους, καθώς και την αποτελεσματικότητα στη διαφοροποίηση των *M. tuberculosis* στελεχών (de Boer *et al.*, 1999, Cohn and O'Brien 1998, Yeh *et al.*, 1998). Οι μέθοδοι θα πρέπει να είναι εύκολα εφαρμόσιμες, γρήγορες, προσιτές και τα αποτελέσματά τους να είναι συγκρίσιμα μεταξύ των εργαστηρίων.

Οι τεχνικές γονοτύπησης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε όλο τον κόσμο, σε μια προσπάθεια κατανόησης τη δομή των *M. tuberculosis* στελεχών που οδηγεί σε παγκόσμια

επιδημία φυματίωσης. Επέτρεψαν την ακριβή διάκριση μεταξύ υποτροπής και την εκ νέου μόλυνση από φυματίωση (Small *et al.*, 1993, Kruuner *et al.*, 2002, van Rie *et al.*, 1999). και έχουν χρησιμοποιηθεί για να αποδείξουν συν-μολύνσεις με πολλαπλά στελέχη φυματίωσης (μικτές λοιμώξεις) (Braden *et al.*, 2001, Richardson *et al.*, 2002, Warren *et al.*, 2004, Stavrum *et al.*, 2009, Yeh *et al.*, 1999, Mendez *et al.*, 2009), ένα φαινόμενο που μπορεί να οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα. Σε ορισμένες μελέτες επίσης χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση υποθέσεων εργαστηριακών διασταυρούμενων μολύνσεων στη διάγνωση του *M. tuberculosis*. Αυτό έχει αποδειχθεί χρήσιμο όχι μόνο για την επιβεβαίωση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω της εργαστηριακής διασταυρούμενης μόλυνσης, αλλά και για την επιβεβαίωση της πηγής της μόλυνσης (π.χ. μολυσμένα αντιδραστήρια) (Martinez *et al.*, 2006, Yan *et al.*, 2005). Χρησιμοποιώντας μοριακές γονοτυπικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των οικογενειών των στελεχών που σχετίζονται με αντοχή, σε παγκόσμιο επίπεδο επέτρεψε τη μελέτη των πιθανών μικροβιακών παραγόντων που σχετίζονται με τη μετάδοση ή / και τη νόσο. Τέλος, έχουν ενισχύσει σε μεγάλο βαθμό την κατανόηση της παγκόσμιας μετάδοσης του *M. tuberculosis* με τη χρήση των διεθνών βάσεων δεδομένων που συγκρίνουν στελέχη σε εκτεταμένες γεωγραφικές περιοχές

Μέχρι σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός των εργαλείων γονότυπου για γονοτύπιση του *M. tuberculosis* υπάρχουν, όπως η μεθοδολογία spoligotyping (Sola *et al.*, 2001, Brudey *et al.*, 2006, Filliol *et al.*, 2002, Filliol *et al.*, 2003), η μεθοδολογία IS6110 -ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (IS6110-RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), Ποικίλου Αριθμού Διαδοχικές Επαναλήψεις – Μυκοβακτηριακά Διάσπαρτα Επαναλαμβανόμενα Στοιχεία [Variable Number Tandem Repeat - Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit (VNTR-MIRU)] και τυποποίηση πολυδιαχωριστικών περιοχών προσδιορισμού αλληλουχίας [Multispacer Sequence Typing (MST)] έχουν διεθνώς τυποποιηθεί και είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες.

1.12.1 Ανάλυση IS6110-RFLP

Η μέθοδος αυτή προτάθηκε από τον van Embden το 1993 (van Embden *et al.*, 1993) και χαρακτηρίστηκε ως μέθοδος αναφοράς για τυποποίηση της φυματίωσης για μοριακές επιδημιολογικές μελέτες (Kato-Maeda *et al.*, 2011, Ei *et al.*, 2016). Ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για τη διαφοροποίηση στελεχών του *M. tuberculosis*. Το IS6110-RFLP είναι πιθανώς η πιο γνωστή προσέγγιση υβριδισμού Southern blot. Βασίζεται στον πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων περιορισμού (restriction fragment length polymorphism, RLFP) της αλληλουχίας ένθεσης (insertion sequencing, IS) 6110 (IS6110) του γονιδιώματος *M. tuberculosis* (Hermans *et al.*, 1990, McAdam *et al.*, 1990, Thierry *et al.*, 1990, Thierry *et al.*, 1990) και κατανέμεται σε όλο το γονιδίωμα. Ο αριθμός και η κατανομή των στοιχείων IS6110 εντός του γονιδιώματος του *M. tuberculosis* είναι διαφορετικά μεταξύ στελεχών. Τα στοιχεία IS6110 είναι περισσότερο ή λιγότερο τυχαία κατανεμημένα σε όλο το γονιδίωμα, με αριθμό αντίγραφων που κυμαίνονται από σπάνια στελέχη που δεν διαθέτουν στοιχεία IS6110 σε στελέχη με 26 αντίγραφα (Wall *et al.*, 1999, Hermans *et al.*, 1990, Kurepina *et al.*, 1998, van Soolingen *et al.*, 1991, McHugh *et al.*, 1998, Sampson *et al.*, 2001.). Αν και το IS6110 μπορεί να ενσωματωθεί σε οποιοδήποτε σημείο του χρωμοσώματος, υπάρχουν περιοχές με μεγαλύτερη συχνότητα μεταφοράς. Το IS6110 στα περισσότερα μέλη του *M. tuberculosis* Complex η αλληλουχία είναι σε πολλαπλά αντίγραφα, με εξαίρεση το *M. bovis* που περιέχει μόνο ένα αντίγραφο (Jagielski *et al.*, 2014).

Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή διακριτική ικανότητα (Kato-Maeda *et al.*, 2011) και επαναληψιμότητα, άλλα έχει αρκετούς περιορισμούς. Η μέθοδος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα για την τυποποίηση στελεχών με περισσότερες από 6 ενθέσεις IS6110 επειδή πολλές από τις περιοχές εισαγωγής του IS6110 είναι έντονα διατηρημένες σε τέτοια στελέχη. Είναι σχετικά αργή, τεχνικά απαιτητική και απαιτεί σημαντική ποσότητα καλής ποιότητας DNA από βιώσιμες καλλιέργειες (Millan-Lou *et al.*, 2012). Η ενδο-εργαστηριακή συγκριτική ανάλυση των προτύπων RFLP μπορεί να είναι κουραστική και απαιτεί τη χρήση εξελιγμένων λογισμικών και έμπειρο προσωπικό με γνώσεις τεχνολογίας (Barlow *et al.*, 2001, Bauer *et al.*, 1999, Rhee *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2000). Δεν είναι σαφές αν τα στελέχη με αντίγραφα λιγότερα από πέντε αντιπροσωπεύουν μια

μεμονωμένη εξελικτική γενεολογία ή έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα και έδωσαν απλό προφίλ εξαιτίας της μεταφοράς του IS6110 σε ευνοϊκές θέσεις ενσωμάτωσης (Fomukong *et al.*, 1997). Τα πρόβλημα συνήθως αντιμετωπίζεται με τη χρήση τεχνικών τυποποίησης όπως spoligotyping και MIRU-VNTR (Kremer *et al.*, 1999)

1.12.2 Spoligotyping

Η μέθοδος spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing) αναπτύχθηκε το 1997, προσδιορίζει και διαφοροποιεί ταυτόχρονα μέλη του *M.tuberculosis* Complex (Kamerbeek *et al.*, 1997). Βασίζεται σε έναν πολυμορφισμό DNA στην περιοχή άμεσης επανάληψης (DR, Direct Repeat) του *M.tuberculosis* Complex, ο οποίος παρουσιάζεται σε στελέχη φυματίωσης (Kamerbeek *et al.*, 1997). Η περιοχή DR περιλαμβάνει μια σειρά από καλά διατηρημένες άμεσες επαναλήψεις (DRs) μήκους 36 ζευγών βάσεων, που είναι διάσπαρτες μεταξύ μοναδικών μη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διαχωριστικών (spacer) μήκους 34-41 bp μήκος (Hermans *et al.*, 1991). Η περιοχή DR και η παρακείμενη μεταβλητή διαχωριστική αλληλουχία (spacer) ονομάζονται άμεση μεταβλητή επανάληψης (DVR, direct variable repeat) (Groenen *et al.*, 1993). Η περιοχή DR είναι μέλος μιας μεγαλύτερης οικογένειας επαναλήψεων που έχουν χαρακτηριστεί ως CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) (Jansen *et al.*, 2002)

Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί απ' ευθείας σε μία ποικιλία δειγμάτων συμπεριλαμβανομένων καλλιεργημένων κυττάρων και κλινικών δειγμάτων (Kamerbeek *et al.*, 1997). Είναι μια σχετικά απλή, οικονομική και υψηλής απόδοσης μέθοδος. Τα αποτελέσματα της είναι ακριβή, αναπαραγώγιμα, εύκολα συγκρίσιμα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και λαμβάνονται σε διάστημα έως 2 ημερών. Τα κύρια μειονεκτήματα της συγκριτικά με τις μεθόδους IS6110-RFLP και MIRU-VNTR είναι ότι χαρακτηρίζει πολυμορφισμούς σε ένα μόνο γενετικό τόπο και όχι σε ολόκληρο το γονιδίωμα του *M. tuberculosis* και η χαμηλότερη διακριτική ικανότητα (Kremer *et al.*, 1999).

1.12.3 MIRU-VNTR Τυποποίηση

Η μέθοδος MIRU-VNTR αναπτύχθηκε το 2000 και σήμερα εφαρμόζεται σε πολλά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο. Πρόκειται για τη νέα μέθοδος αναφοράς γονοτύπησης που έχει αντικαταστήσει την IS6110-RFLP (Supply *et al.*, 2000, Supply *et al.*, 2001, Supply *et al.*, 2006). Παρέχει καλύτερη ανάλυση από το Spoligotyping και ανάλυση συγκρίσιμη με το IS6110-RFLP, ειδικά όταν χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός των 24 τόπων MIRU-VNTR. Βασίζεται σε μεταβλητούς αριθμούς διαδοχικών επαναλήψεων των γενετικών διάσπαρτων στοιχείων σε ξεχωριστή περιοχή στο γονιδίωμα που είναι γνωστά ως μυκοβακτηριδιακές διάσπαρτες επαναλαμβανόμενες μονάδες (MIRUs, mycobacterial interspersed repetitive units) με μήκος 40-100 bp (Supply *et al.*, 2001). Η μέθοδος αξιολογεί τον αριθμό των MIRUs τα οποία είναι κατανεμημένα σε όλο το γονιδίωμα (Allix-Beguec *et al.*, 2008) και εάν ο αριθμός των αντιγράφων της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας ποικίλλει μεταξύ των στελεχών. Πρακτικά εφαρμόζεται PCR όπου χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές για την ενίσχυση των τόπων και για τον προσδιορισμό των μεγεθών των προϊόντων PCR, δηλαδή του αριθμού των επαναλήψεων. Τα πρωτόκολλα που έχουν προταθεί περιλαμβάνουν 12 ή 15 ή 24 τύπους. Ο προσδιορισμός του μεγέθους μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είτε με ένα τριχοειδές σύστημα για υψηλότερη απόδοση (Supply *et al.*, 2001, Kwara *et al.*, 2003, Mazars *et al.*, 2001). Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους αριθμούς οι οποίοι εύκολα μπορούν να αναγνωριστούν και να συγκριθούν με μια διεθνή βάση δεδομένων (MIRU-VNTRplus).

Το στέλεχος αναφοράς *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, περιέχει 41 τύπους MIRU, εκ των οποίων πολλές είναι πολυμορφικές και χρησιμοποιούνται σήμερα σε πρότυπο τυποποίησης MIRU-VNTR (Supply *et al.*, 2000). Η διακριτική δύναμη της τυποποίησης MIRU-VNTR είναι ανάλογη με τον αριθμό των τόπων που αξιολογούνται και η επιλογή των τόπων καθοδηγείται από το σκοπό της μελέτης. Για μικρές επιδημιολογικές μελέτες χρησιμοποιούνται 12 και 15 τόποι, ενώ για φυλογενετική ανάλυση προτιμώνται οι 24 τύπους γιατί παρέχουν υψηλότερη διακριτική ικανότητα και συγκρίσιμη με εκείνη του IS6110-RFLP (Supply *et al.*, 2006, Kremer *et al.*, 2005). Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η χαμηλού βαθμού αναπαραγωγικής ικανότητας της ηλεκτροφόρησης σε σχέση με την

ανάλυση σε τριχοειδές σύστημα και η χαμηλότερη διακριτική ικανότητα της από την IS6110 όταν χρησιμοποιούνται οι 12 τόποι.

1.12.4 Τυποποίηση πολυδιαχωριστικών περιοχών προσδιορισμού αλληλουχίας Multispacer Sequence Typing (MST)

Η μέθοδος Multispacer Sequence Typing (MST) προτάθηκε το 2008 από τους *Djelouadi et al.* ως μια νέα μέθοδος γονοτύπησης του *M. tuberculosis* (*Djelouadi et al., 2008*). Βασίζεται στην ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας διαγονιδιακών διαχωριστικών περιοχών (intergenic spacers) που επιλέχθηκαν έπειτα από σύγκριση της ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του *M. tuberculosis*, καταλήγοντας σε ένα γενετικό προφίλ με βάση την αλληλουχία (*Drancourt et al., 2004*). Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως για την εύρεση του γενετικού προφίλ και σε άλλα παθογόνα με υψηλή ομοιογένεια, για παράδειγμα η *Yersinia pestis* (*Drancourt et al., 2004*) η *Coxiella burnetii* (*Glazunova et al., 2005*) και η *Bartonella henselae* (*Li et al., 2006*). Συγκεκριμένα, η μέθοδος στηρίζεται στην ανάλυση και σύγκριση της αλληλουχία οκτώ μεταβλητών διαγονιδιακών διαχωριστικών περιοχών (variable intergenic spacers). Αυτές οι οκτώ περιοχές περιλαμβάνουν τέσσερις γνωστούς τύπους μεταβλητού αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων (Variable Number Tandem Repeat, VNTR), έναν τύπο μοναδικού νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) και τρεις νέες διαχωριστικές περιοχές. Στις τέσσερις περιοχές μεταβλητού αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων (MST4, MST11, MST12, MST13) έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των διαφόρων στελεχών ποικιλία στον αριθμό και το μέγεθος (bp) των αλληλοδιαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, σημειακές μεταλλάξεις και διαγραφές. Οι τρεις νέες διαγονιδιακές περιοχές (MST1, MST2, MST3) έχουν είτε διαγραφές είτε σημειακές μεταλλάξεις είτε συνδυασμό αυτών και στην διαγονιδιακή περιοχή SNP (MST8) μόνο σημειακές μεταλλάξεις. Ως εκ τούτου το μέγεθος των επτά διαγονιδιακών διαχωριστικών περιοχών (εξαιρέση η διαχωριστική περιοχή MST8) μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ των διαφόρων στελεχών *M. tuberculosis* και να είναι μεγαλύτερο από 400-600bp της αλληλουχία αναφοράς του *M. tuberculosis* H37Rv (*Djelouadi et al., 2008*). Η κάθε μια από

τις οχτώ διαδοχικές διαγονιδιακές περιοχές ενισχύεται με την μέθοδο PCR, αναλύεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία (sequencing) και συγκρίνεται με τις αλληλουχίες άλλων στελεχών που είναι καταχωρημένες σε μια διεθνή βάση δεδομένων με ελεύθερη πρόσβαση (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/MST_MTuberculosis/mst). Οι προκύπτουσες αλληλουχίες για κάθε τόπο αποτελούν ξεχωριστά διαχωριστικά αλλήλια (spacer alleles) και ο συνδυασμός τους αποδίδει ένα προφίλ διαχωριστικού τύπου (Spacer Type profile, ST profile), το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε στέλεχος *M. tuberculosis*. Στελέχη με το ίδιο ST προφίλ κατατάσσονται στον ίδιο κλώνο. Η κατανομή των στελεχών του *M. tuberculosis* σε ST προφίλ συσχετίζεται και με την εκχώρησή τους στις φυλογεωγραφικές γραμμές (phylogeographical lineages). Τα νέα ST προφίλ κάποιων στελεχών εισάγονται στη βάση δεδομένων ώστε να είναι διαθέσιμα και συγκρίσιμα με εργαστήρια άλλων χωρών. Η φυλογενετικής εξέλιξης των μυκοβακτηρίων αποτελεί αιτία των μεταβολών μεταξύ των αλληλουχιών των διαφόρων στελεχών *M. tuberculosis*.

Η MST καθιερώθηκε για τον προσδιορισμό του γονότυπου των στελεχών του *M. tuberculosis* αφού αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μια μέθοδο ευαίσθητη, ακριβής, αναπαραγώγιμη και σύμφωνη με την εκχώρηση φυλογεωγραφικής γραμμής. Επίσης, απαιτεί ελάχιστο DNA για τον προσδιορισμό *M. tuberculosis* και είναι λιγότερο επίπονη συγκριτικά με τις μεθόδους MIRU-VNTR και IS6110-RFLP. Βάση αυτών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική των μεθόδων αναφοράς για τον προσδιορισμό των γονοτύπων στελεχών *M. tuberculosis* στις επιδημιολογικές μελέτες (Djelouadji *et al.*, 2008).

ΣΚΟΠΟΣ

Στην Ελλάδα, τα δεδομένα των μοριακών μηχανισμών αντοχής στα πρώτης και δεύτερης γραμμής αντιφυματικά φάρμακα του *Mycobacterium tuberculosis* είναι περιορισμένα σε μια χρονική περίοδο, όπου παρατηρείται παγκοσμίως αύξηση των ανθεκτικών στελεχών της φυματίωσης.

Σκοπός της μελέτης ήταν

- 1/ προσδιορισμός του ποσοστού αντοχής στα 1^{ης} γραμμής (INH, RIF, EMB, PZA) και 2^{ης} γραμμής αντιφυματικά (STR) σε στελέχη *Mycobacterium tuberculosis* που απομονώθηκαν στην Κεντρική Ελλάδα κατά τη χρονική περίοδο 2009-2017
- 2/ ανίχνευση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντιφυματικά
- 3/ εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της εμπορικής μεθόδου Genotype MTBDRplus (HAIN) στην μοριακή ανίχνευση της αντοχής
- 4/ διερεύνηση της ύπαρξης πολυμορφισμών για επιδημιολογικές μελέτες και διαχωρισμό τους από μεταλλάξεις που προκαλούν αντοχή.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ

A. Επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων για ανίχνευση και απομόνωση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (ενότητα 2.2)

B. Άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού στο κλινικό δείγμα

1. Χρώση Ziehl- Neelsen (ενότητα 2.3)

2. Μοριακή μέθοδος (ενότητα 2.5)

*εφόσον ανιχνεύεται ο μικροοργανισμός ακολουθεί μοριακή μέθοδος για ανίχνευση μεταλλάξεων σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη

Γ. Καλλιέργεια του κλινικού δείγματος σε υγρό (MGIT) και στερεό θρεπτικό υλικό (Lowenstein-Jensen) (ενότητα 2.4)

Δ. Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού και έλεγχος ευαισθησίας σε πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντιφυματικά (ενότητα 2.5, 2.6)

Ε. Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή σε πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντιφυματικά (ενότητα 2.7)

ΣΤ. Τυποποίηση των στελεχών βάσει MIRU και MST (ενότητα 2.8)

Ζ. Συσχέτιση της έκφρασης αντοχής και των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν

Η. Συσχέτιση πολυμορφισμών και κλώνων

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν 265 στελέχη *M. tuberculosis* Complex, που απομονώθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) το χρονικό διάστημα 2009-2017. Τα στελέχη προέρχονταν από κλινικά δείγματα ασθενών ύποπτα για πνευμονική και εξωπνευμονική φυματίωση οι οποίοι νοσηλεύτηκαν σε κλινικές του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας καθώς και της Πνευμονολογικής κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και του Γενικού Νοσοκομείου Λαμίας. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (SB 28270).

Όλες οι διαδικασίες (επεξεργασία δειγμάτων, καλλιέργεια, έλεγχος ευαισθησίας στα αντιφυματικά αντιβιοτικά, εκχύλιση DNA) διεξήχθησαν σε εργαστήριο βιοασφάλειας επιπέδου III (biosecurity level III, BSL-3) και σε θάλαμο βιολογικής ασφαλείας επιπέδου II. Όλες οι PCR πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής κλάσης II, κάθετου τύπου, για να αποφευχθούν οι μολύνσεις.

2.2 Επεξεργασία κλινικών δειγμάτων

Γενικά

Τα περισσότερα κλινικά δείγματα προέρχονταν κυρίως από ασθενείς με πνευμονική φυματίωση, και ως εκ τούτου ήταν επί το πλείστον πτύελα και βρογχικές εκκρίσεις. Τα συγκεκριμένα βιολογικά υλικά, λόγω του ότι περιέχουν αρκετή βλέννα και πλούσια φυσιολογική χλωρίδα αναπνευστικής οδού, πρέπει να υποστούν ειδική κατεργασία πριν την καλλιέργεια για απομόνωση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Η κατεργασία για τη ρευστοποίηση της βλέννας και την καταστροφή των μικροοργανισμών της φυσιολογικής χλωρίδας έγινε με το εμπορικό κιτ BBL MycoPrep (Becton Dickinson).

Αρχή μεθόδου

Το κιτ BBL MycoPrep βασίζεται στη δράση της Ν-ακετυλο-L-κυστεΐνης (NALC) που σε συνδυασμό με 2%NaOH αποτελούν έναν αποτελεσματικό βλεννολυτικό και απολυμαντικό παράγοντα. Επιπλέον, περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για την μείωση της δράσης του διαλύματος NALC-NaOH κατά την τελική ανάκτηση των μυκοβακτηριδίων.

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία ρευστοποίησης και απομάκρυνσης των υπολοίπων μικροβίων πλην των μυκοβακτηριδίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντιδραστηρίων του εμπορικού κιτ BBL MycoPrep Specimen Digestion/ Decontamination (Becton Dickinson) βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

Αρχικά, παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=6,8) αδειάζοντας το φακελάκι που περιείχε τη σκόνη φωσφορικών (Phosphate Buffer (pH 6.8) σε μια ογκομετρική φιάλη 500mL και προστέθοντας 500mL απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε ήπια ανάδευση για τη διαλυτοποίηση της σκόνης φωσφορικών. Το περιεχόμενο μοιράστηκε σε μικρότερες φιάλες με βιδωτό καπάκι και αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15λεπτά με ξεσφιγμένο καπάκι. Μετά την αποστείρωση και μόλις το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου σφραγίστηκε το καπάκι.

Κάθε φιάλη αντιδραστηρίου NaOH, περιείχε μια γυάλινη αμπούλα γεμάτη NaCl. Για την παρασκευή του διαλύματος NALC-NaOH (το οποίο διατηρείται 24 ώρες): ξεσφίχτηκε το καπάκι της φιάλης, εντοπίστηκε η γυάλινη φύσιγγα, αφαιρέθηκε ο περίσσιος αέρας από τη φιάλη, βιδώθηκε το καπάκι και έγινε σπάσιμο της γυάλινης φύσιγγας.

Τα κλινικά δείγματα πλην του αίματος μεταφέρθηκαν όλα σε ειδικά σωληνάρια τύπου falcon των 50mL και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 4.200 rpm. Έγινε απόρριψη του υπερκειμένου, προστέθηκαν 20ml NALC-NaOH σε κάθε δείγμα ή 25ml NALC-NaOH σε παχύρευστα δείγματα και αναμείχθηκαν για 30sec, ώστε να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Ακολούθησε περιδίνηση για 15 λεπτά σε ειδική πλάκα τύπου Vortex με ενσωματωμένες θέσεις όπου τοποθετήθηκαν τα σωληνάρια τύπου falcon των 50mL, για να ρευστοποιηθούν (BE 38, BICASA). Στο εκάστοτε σωληνάριο προστέθηκε διάλυμα

φωσφορικών μέχρι τελικό όγκο 50ml. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 4.200 rpm, απόρριψη του υπερκευμένου και προσθήκη 1-2mL πενικιλίνης για σκοτωθούν τα υπόλοιπα μικρόβια.

2.3 Χρώση Ziehl-Neelsen

Αρχή της μεθόδου

Ο σκοπός της χρώσης είναι η ανίχνευση των οξεάντοχων μυκοβακτηριδίων και η διάκριση τους από τους υπόλοιπους μικροοργανισμών. Ο μηχανισμός της χρώσης συνδέεται με τη διαφορά του κυτταρικού τοιχώματος των οξεάντοχων μυκοβακτηριδίων με τα υπόλοιπα βακτήρια. Η ιδιότητα της οξεοαντοχής των μυκοβακτηριδίων αποκτάται σε κάποιο συγκεκριμένο στάδιο του βιολογικού τους κύκλου, λόγω της παρουσία μυκολικών οξέων πάνω στην επιφάνεια του μυκοβακτηριακού κυττάρου (Madigan *et al.*, 2003). Η τεχνική βασίζεται στη χρήση της χρωστικής φαινικούχου φουξίνης, η οποία είναι πιο διαλυτή από τις κλασσικές χρωστικές. Αποτελείται από βασική φουξίνη, φαινόλη και 95% αιθανόλη. Η φαινόλη ενισχύει τη διείσδυση και την ισχυρή ένωση της φουξίνης στο υψηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων, εμποδίζοντας τον αποχρωματισμό από το διάλυμα οξυνομένου οιοπνεύματος (πυκνό HCL και 95% οινόπνευμα). Τα οξεάντοχα βακτήρια βάφονται ερυθρά, ενώ τα υπόλοιπα μπλέ από το διάλυμα κυανό του μεθυλενίου.

Πειραματική διαδικασία

Η χρώση Ziehl-Neelsen πραγματοποιήθηκε στις εξής περιπτώσεις:

α/ σε αρχικά κλινικά δείγματα που συλλέχθηκαν στο εργαστήριο, έπειτα από την επεξεργασία που αναφέρθηκε στην ενότητα 2.2, για τον έλεγχο παρουσίας οξεάντοχου μυκοβακτηριδίου

β/ σε θετικά δείγματα έπειτα από την ανάπτυξη καλλιέργειας MGIT ή/και LJ για την επιβεβαίωση ύπαρξης μυκοβακτηριδίου και ταυτοποίησης του *M.tuberculosis* Complex

γ/ σε εναιωρήματα κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στο αντιβιογράμμα για έλεγχο καθαρότητας του δείγματος.

Μια σταγόνα δείγματος μεταφέρθηκε και απλώθηκε στην κεντρική περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας. Για την μονιμοποίηση του μυκοβακτηριδίου, θερμάνθηκε το παρασκεύασμα σε θερμαινόμενη πλάκα στους 100°C όλο το βράδυ, χωρίς να υπερθερμανθεί. Επί του παρασκευάσματος προστέθηκε ισχυρή φαινικούχους φουξίνη (Becton Dickinson) μέχρι να καλυφθεί όλη η αντικειμενοφόρος πλάκας (Mediaware). Για την εισαγωγή της χρωστικής στα μυκοβακτηριακά κύτταρα έγινε θέρμανση με φλόγα για 5 λεπτά. Η φουξίνη διείσδυσε στα λιπίδια και χρωμάτισε κόκκινα όλα τα οξεάντοχα μυκοβακτηρίδια. Στην συνέχεια, απομακρύνθηκε η περίσσεια της χρωστικής με νερό βρύσης και έγινε προσθήκη οξινισμένου οιοπνεύματος για 2 λεπτά (Becton Dickinson). Στο στάδιο αυτό αποχρωματίστηκε η φουξίνη από τα μικροβιακά κύτταρα πλην των οξεάντοχων βακτηρίων. Τέλος, έπειτα από μια ακόμη έκπλυση, προστέθηκε μια άλλη χρωστική το κυανού του μεθυλενίου (Becton Dickinson) για 1 λεπτό και ξεπλύθηκε με νερό βρύσης. Σε αυτό το στάδιο χρωματίστηκαν κυανά όλα τα βακτήρια και τα επιθηλιακά κύτταρα. Η περίσσεια νερού απομακρύνθηκε με διηθητικό χαρτί, χωρίς να συρθεί στην επιφάνεια της πλάκας. Ακολούθησε μικροσκόπηση με οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS) σε μεγέθυνση x100 με χρήση ειδικού λαδιού. Οι οξεάντοχοι οργανισμοί στο παρασκεύασμα είχαν κόκκινο χρώμα, ενώ οι μη οξεάντοχοι κυανό. Τα στελέχη *M.tuberculosis* βάφθηκαν κόκκινα.

2.4 Καλλιέργεια και απομόνωση των μυκοβακτηριδίων

Σε όλα τα κλινικά δείγματα έγινε καλλιέργεια σε φιαλίδια υγρής φάσης (MGIT 960) και σε σωληνάρια στερεής καλλιέργειας Lowenstein-Jensen.

2.4.1 Καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό, MGIT 960

Αρχή μεθόδου

Το σύστημα Bactec MGIT 960 (Bactec MGIT, BBL, Becton Dickinson) είναι ένα πλήρως αυτοματοποιημένο και συνεχής παρακολούθησης σύστημα για την ανάπτυξη και

την ανίχνευση του μυκοβακτηριδίου (Williams-Bouyer *et al.*, 2000, Augustinowic-Korec *et al.*, 2002, Yuksel *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, πρόκειται για καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό. Έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης εξέτασης έως και 960 φιαλιδίων και μέτρησης φθορισμού από ειδικό φωτοανιχνευτή κάθε 1 ώρα (Hillemann *et al.*, 2006). Τα σωληνάρια MGIT περιέχουν 7ml 7H9 τροποποιημένο υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook με γλυκερίνη, το οποίο διευκολύνει την ανάπτυξη και ανίχνευση των μυκοβακτηρίων (Yamane *et al.*, 1996, Saito, 1998, Leung *et al.*, 2012). Επιπλέον, στον πυθμένα τους διαθέτουν σιλικόνη εμποτισμένη με μια φθορίζουσα ένωση (σύμπλοκο του ρουθινίου), ευαίσθητη στην παρουσία του οξυγόνου το οποίο είναι διαλυμένο στο υγρό υλικό. Η αρχική συγκέντρωση του οξυγόνου εμποδίζει την εκπομπή φθορισμού από την ένωση και είναι δυνατή η ανίχνευση ελάχιστου φθορισμού, όταν το σωληνάριο ακτινοβοληθεί με υπεριώδη ακτινοβολία (365nm). Αργότερα, τα ζωντανά ενεργά μυκοβακτήρια καταναλώνουν και μειώνουν το οξυγόνο, οδηγώντας τη φθορίζουσα ένωση να φθορίζει. Η ποσότητα φθορισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη του επιπέδου του οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας, υποδεικνύοντας την κατανάλωση οξυγόνου λόγω ανάπτυξης του μυκοβακτηριδίου (Hillemann *et al.*, 2006).

Σημαντικό ρόλο, επίσης, στην καλλιέργεια του μυκοβακτηριδίου παίζει η προσθήκη δυο διαλυμάτων, του OADC ενός εμπλουτιστικού υλικού για την ενίσχυση της ανάπτυξης του μυκοβακτηριδίου και του PANTA ενός μείγματος αντιβιοτικών για την απομάκρυνση των υπολοίπων βακτηρίων από την καλλιέργεια. Το OADC (Oleic Acid Dextrose Citrate) είναι ένα υγρό διάλυμα που περιέχει ολεϊκό οξύ (Oleic acid), αλβουμίνη (Albumin), δεξτρόζη (Dextrose) και καταλάση (Catalase). Το ολεϊκό οξύ μεταβολίζεται από τους βακίλους της φυματίωσης και έχει καταλυτικό ρόλο στον μεταβολισμό των μυκοβακτηριδίων. Η αλβουμίνη δρα ως προστατευτικός παράγοντας και προσδένεται με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία μπορεί να είναι τοξικά για είδη του γένους *Mycobacterium*. Η δεξτρόζη χρησιμεύει σαν πηγή ενέργειας και η καταλάση καταστρέφει τα τοξικά υπεροξειδία που πιθανώς να παραχθούν κατά τη διάρκεια της επώασης. Το PANTA είναι ένα μείγμα αντιμικροβιακών παραγόντων σε λυοφιλιωμένη μορφή. Περιέχει τα εξής αντιβιοτικά: τη πολυμιξίνη Β (αναστέλλει τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια), την αμφοτερισίνη Β (αναστέλλει τους μύκητες), το ναλιδιξικό οξύ (αναστέλλει τα αρνητικά

κατά Gram βακτήρια), τη τριμεθοπρίμη (αναστέλλει τα περισσότερα αερόβια βακτήρια) και την αζλοσιλλίνη (αναστέλλει την *Pseudomonas aeruginosa*).

Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα έπειτα από την επεξεργασία, που προαναφέρθηκε, εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MGIT 960 (Becton Dickinson). Αρχικά, έγινε ανασύσταση του διαλύματος MGIT OADC/ PANTA, μεταφέροντας όλο το υγρό διάλυμα BD MGIT OADC (4mL) (Becton Dickinson) στο φιαλίδιο BD MGIT PANTA (Becton Dickinson) που περιείχε το λυοφιλιωμένο μείγμα αντιβιοτικών. Από το ανασυσταμένο διάλυμα OADC/ PANTA μεταφέρθηκαν 800μL στο υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MGIT 960. Ακολούθησε εμβολιασμός 500μL δείγματος (περίπου 10 σταγόνες) με αποστειρωμένη πιπέτα pasteur και καλή ανάμιξη. Το σωληνάριο εισήχθη στο αυτοματοποιημένο μηχάνημα MGIT 960 (Bactec MGIT, BBL, Becton Dickinson) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιβεβαιώθηκε ότι η σειρά των σωληνάρων στο σύστημα MGIT 960 ήταν η σωστή και αντιστοιχούσε στην σωστή θέση. Η επώαση του δείγματος διήρκησε 40-42 μέρες, εκτός αν το μηχάνημα ανίχνευε ανάπτυξη μικροοργανισμού σε λιγότερες μέρες. Τα σωληνάρια στα οποία αναπτύχθηκε μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης χαρακτηρίστηκαν ως «θετικά» και χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία.

2.4.2 Καλλιέργεια Löwenstein-Jensen

Αρχή μεθόδου

Το μέσο καλλιέργειας Löwenstein-Jensen (L-J) είναι στερεό θρεπτικό μέσο με βάση το αυγό. Βασίζεται στη χρωστική, το πράσινο του μαλαχίτη που αναστέλλει τα ανεπιθύμητα βακτήρια και περιέχει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων (Lowenstein, 1933, Lowenstein, 1931, Jensen, 1932).

Το Lowenstein-Jensen είναι υλικό καλλιέργειας κατάλληλο για μικροοργανισμούς με υψηλές και σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις, όπως τα μυκοβακτήρια και συγκεκριμένα το *M. tuberculosis* (Elbir *et al.*, 2008). Περιέχει λεύκωμα, λεκιθίνη του αυγού της όρνιθας, γλυκερίνη (διευκολύνει την ανάπτυξη του μικροβίου), ασπαραγίνη, δισοξινοφωσφορικό

κάλιο, θειϊκό μαγνήσιο, κιτρικό μαγνήσιο και μια χρωστική, το πράσινο του μαλαχίτη (Yamane *et al.*, 1996, Saito, 1998, Leung *et al.*, 2012).

Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα έπειτα από την επεξεργασία, που προαναφέρθηκε, εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Lowenstein-Jensen (bioMérieux). Συγκεκριμένα, προστέθηκαν περίπου πέντε σταγόνες του επεξεργασμένου δείγματος με στείρα πιπέτα Pasteur στο σωληνάριο Lowenstein-Jensen. Ακολούθησε επώαση των σωληνάρων με χαλαρωμένα τα καπάκια τους και σε επίπεδη θέση τουλάχιστον για μία εβδομάδα στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 10% CO₂, ώστε να γίνει καλή κατανομή του δείγματος. Έπειτα, τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν κατακόρυφα ή σε πλάγια θέση με σφιχτά τα καπάκια για να αποφευχθεί η ξήρανση του θρεπτικού υλικού. Η επώαση τους συνεχίστηκε για 3-7 εβδομάδες στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 10% CO₂ και 90% αέρα. Τα δείγματα στα οποία υπήρξε ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου της φυματώσης εμφανίζονταν χαρακτηριστικές κίτρινες ή κρεμ αποικίες.

2.5 Ανίχνευση και ταυτοποίηση των στελεχών *M. tuberculosis* Complex

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των στελεχών *M.tuberculosis* Complex χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι, και κυρίως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Το ίδιο εργαστηριακό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε είτε για άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού στο κλινικό δείγμα είτε για ταυτοποίηση του μικροοργανισμού ο οποίος αναπτύχθηκε σε καλλιέργεια. Τα στάδια της διαδικασίας περιγράφονται αναλυτικά στις ενότητες 2.5.1. έως 2.5.4.

2.5.1 Εκχύλιση DNA είτε από το κλινικό δείγμα είτε από θετική καλλιέργεια

Το DNA είναι το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών και σε αυτό βασίζονται οι πειραματικές διεργασίες της μοριακής μικροβιολογίας. Η απομόνωση του σε καθαρή μορφή, χωρίς άλλες ουσίες αποτελεί την προϋπόθεση για την αποφυγή ουσιών που

αναστέλλουν την δράση της DNA πολυμεράσης και οδηγούν σε μερική ή καθόλου ενίσχυση του προϊόντος. Καθώς το DNA βρίσκεται στο εσωτερικό των κυττάρων είναι απαραίτητο να διασπαστούν οι κυτταρικές μεμβράνες και οι μεμβράνες των υποκυτταρικών οργανιδίων όπως ο πυρήνας, απελευθερώνοντας το γενωμικό υλικό σε διαλυτή μορφή. Σημαντικό επίσης βήμα είναι η απομάκρυνση των άλλων μακρομορίων, όπως RNA και πρωτεΐνες.

Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση βασίστηκε στο αρνητικά φορτισμένο DNA και στην χρήση στηλών διοξειδίου του πυριτίου. Συγκεκριμένα, το DNA συνδέεται με τα μόρια του διοξειδίου του πυριτίου, ενώ τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με πλύση και έπειτα από έκλυση παραλαμβάνεται το DNA (Hoelzel, 1998).

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό κιτ Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research). Όλα τα στάδια έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ο οποίος παρέχει τα διαλύματα, τις στήλες εκχύλισης και τα σωληνάρια συλλογής για να εκτελεστεί η απομόνωση του γενετικού υλικού. Η εξαγωγή γενετικού υλικού έγινε από διαφορετικό θρεπτικό υλικό ανάλογα με το στάδιο της διαδικασίας του προς εξέταση δείγματος. Η επιβεβαίωση της ανάπτυξης του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης σε υγρό μέσο καλλιέργειας MGIT 960 πραγματοποιήθηκε έπειτα από απομόνωση του γενετικού υλικού αιωρούμενων αποικιών που αναπτύχθηκαν στο μέσο αυτό. Αντιστοίχως, η απομόνωση γενετικού υλικού από καθαρές αποικίες *M.tuberculosis* στο 7H11 Middlebrooth άγαρ ήταν απαραίτητη για την τυποποίηση των στελεχών και το μοριακό έλεγχο των γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα αυτών.

Σε σωληνάριο τύπου erpendorf ~1,7ml αναμείχτηκαν 800μL λυτικού διαλύματος (Genomic Lysis Buffer) και 200 μL εναιωρήματος κυττάρων από καλλιέργεια σε 7H10 Middlebrooth άγαρ ή υγρού μέσου καλλιέργειας MGIT 960. Το εναιώρημα μυκοβακτηριδίων ήταν θολρότητας 2 της κλίμακας McFarland. Το μείγμα αναδεύτηκε σε συσκευή vortex (BE 101V, BICASA), επώαστηκε 5 λεπτά για την λύση των κυττάρων και μεταφέρθηκε σε στήλη εκχύλισης (Zymo-Spin Column). Ακολούθησε, φυγοκέντρηση αυτών (Certifigure 5424, Eppendorf, Germany) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στις 11.000 rpm, με αποτέλεσμα τη πρόσδεση του DNA των μυκοβακτηριδίων σε αυτές. Στη

συνέχεια, η στήλη Zymo-Spin Column τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάριο συλλογής, προστέθηκαν 200μl διαλύματος εκπλύσεως, DNA Pre-Wash Buffer και φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στις 11.000 rpm. Έγινε απόρριψη του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής, η στήλη τοποθετήθηκε ξανά στο σωληνάριο συλλογής και προστέθηκαν 500μl διαλύματος εκπλύσεως, g-DNA Wash Buffer. Έπειτα οι στήλες φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 11.000 rpm, ώστε να απομακρυνθεί κάθε υπόλειμμα διαλύματος από το φίλτρο. Οι εκπλύσεις είχαν ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση πρωτεϊνών, RNA και όλων των υπόλοιπων μοριών. Το σωληνάριο συλλογής απορρίφθηκε, η στήλη Zymo-Spin Column τοποθετήθηκε σε καθαρό σωληνάριο έκλουσης και προστέθηκαν 50μl διαλύματος έκλουσης, DNA Elution Buffer. Έπειτα από επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 30 δευτερόλεπτα στις μέγιστες στροφές (14.600 rpm) και απορρίφθηκε. Στο σωληνάριο συλλογής περιέχονταν το DNA και συντηρήθηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση του στις μοριακές τεχνικές της μελέτης.

2.5.2. Αρχές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος εκθετικής ενίσχυσης ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA-στόχου. Η μέθοδος PCR επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 στην εταιρεία Cetus, ο οποίος τον Οκτώβριο του 1993 βραβεύτηκε με Νόμπελ Χημείας. Η ανακάλυψη της (Saiki *et al.*, 1985, Mullis and Faloona, 1987) και η γρήγορη βελτιστοποίηση της με τη χρήση μιας θερμοσταθερής Taq DNA πολυμεράσης από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988) έφερε επανάσταση στη μοριακή διαγνωστική. Χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική για ερευνητικούς και διαγνωστικούς σκοπούς.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου DNA που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του 1960. Ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δυο

συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 18-22 βάσεων, που ονομάζονται εκκινητές (primers) και οι οποίοι ορίζουν την περιοχή πολλαπλασιασμού. Η δομή τους είναι συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Γι' αυτό είναι απαραίτητο να είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA στόχου. Η δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος, με την παρουσία των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs, deoxynucleotide triphosphates), ιόντων Mg^{++} και κατάλληλων εκκινητών συνθέτει *in vitro* έναν τεράστιο αριθμό αντιγράφων από το αρχικό μόριο (Mullis, 1986, Saiki *et al*, 1988). Η αντίδραση είναι θερμοεξαρτώμενη και η ενίσχυση του τμήματος επιτυγχάνεται σε 30 μέχρι 40 κύκλους εναλλασσόμενων θερμοκρασιών. Ένας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια (Mullis, 1990, Eisenstein, 1990):

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)

Το δίκλωνο μόριο του DNA στόχου μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Η αποδιάταξη επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία (90°C - 95°C) για να διασπαστούν οι δεσμοί υδρογόνου που συνδέουν τους δυο κλώνους, οι οποίοι λειτουργούν στην συνέχεια ως εκμαγεία για τη σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων.

2. Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)

Οι εκκινητές συνδέονται στις δυο πλευρές (5' και 3' άκρο) του DNA στόχου στη συμπληρωματική ακολουθία βάσεων στους αντίστοιχους κλώνους DNA. Η σύνδεση γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 50°C έως 70°C, ανάλογα με το μήκος των εκκινητών, τη σύσταση αυτών και την αλατότητα του διαλύματος. Το ποσοστό των αζωτούχων βάσεων GC επηρεάζει τον υβριδισμό τους με το στόχο.

3. Επιμήκυνση/πολυμερισμός των εκκινητών (extension/elongation)

Επιτυγχάνεται με τη δράση της Taq DNA πολυμεράσης, η οποία αναγνωρίζει την ελεύθερη ομάδα -OH στο 3' άκρο του DNA κάθε εκκινητή, προσθέτει μονομερή τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) σύμφωνα με τον κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων και με κατεύθυνση 5' προς 3'. Η θερμοκρασία επιμήκυνσης κυμαίνεται στους 70-78°C.

Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, η αλληλουχία-στόχος θεωρητικά διπλασιάζεται, αυξάνοντας τον αριθμό των αντιγράφων. Στο τέλος κάθε κύκλου ο στόχος

πολλαπλασιάζεται 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων και επιτυγχάνεται μια γεωμετρική συσσώρευση των πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών-στόχων.

Τα απαραίτητα συστατικά της PCR είναι το DNA εκμαγείο, οι εκκινητές (primers), τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονοκλεοτίδια (dNTPs), η Taq DNA πολυμεράση και το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). Τα ιόντα μαγνησίου δημιουργούν ένα διαλυτό σύμπλεγμα με τα dNTPs το οποίο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA. Η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται και από την συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου ($MgCl_2$). Το ρυθμιστικό διάλυμα ρυθμίζει την τιμή του pH δηλαδή το βέλτιστο pH στο οποίο η δραστηριότητα της πολυμεράσης είναι η καλύτερη δυνατή. Περιέχει άλατα μονοσθενών κατιόντων για την ρύθμιση της θερμοκρασίας αποδιάταξης και επιμήκυνσης αυξάνοντας την ειδικότητα της αντίδρασης και βοηθώντας τον υβριδισμό των εκκινητών. Οι συγκεντρώσεις των αλάτων στο διάλυμα εξαρτώνται από το εκμαγείο και τους εκκινητές. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των αλάτων στο διάλυμα, τόσο πιο γρήγορα αποδιάσσονται τα μεγάλα τμήματα DNA σε σχέση με μικρότερα.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμικούς κυκλοποιητές οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανεβοκατεβάζουν την θερμοκρασία.

Πειραματική διαδικασία της PCR

Το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθεί χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση
1^{ον} των γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα (ενότητες 2.7.2-2.7.7),
2^{ον} των οχτώ μεταβλητών διαγονιδιακών διαχωριστικών περιοχών της μεθόδου MST (ενότητα 2.8.1) και
3^{ον} του γονιδίου *Rv1258c_ctap* για την τυποποίηση στελεχών Beijing με RFLP-PCR (ενότητα 2.8.3).

Το μείγμα αντίδρασης προετοιμάστηκε σε σωληνάριο τύπου eppendorf των 2mL στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II, για να αποφευχθούν οι μολύνσεις. Η ποσότητα ήταν πολλαπλάσια του αριθμού των δειγμάτων συν τους δυο μάρτυρες (αρνητικό και θετικό). Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι ποσότητες κάθε

αντιδραστηρίου που περιείχε το μείγμα της αντίδρασης για ένα δείγμα σε όγκο 45μL (Platinum DNA Polymerase, Invitrogen, UK):

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
10x taq Buffer με KCl	5.0 μl
MgCL ₂ (50mM)	1.5 μl
Μείγμα dNTPs (10mM)	1.0 μl
Primer Forward (25pmol/μL)	0.5 μl
Primer Reverse (25pmol/μL)	0.5 μl
Hotstart DNA πολυμεράση	0.4 μl
dH ₂ O	36.1 μl
Τελικός Όγκος	45 μl

Πίνακας 2.1: Η ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου για το μείγμα της αντίδρασης

Από το συνολικό μείγμα της αντίδρασης μοιράστηκαν 45 μl σε σωληνάρια τύπου eppendorf για PCR όγκου 0,2ml και προστέθηκαν 5 μl εκχυλισμένου DNA μυκοβακτηριδίου. Ο τελικός όγκος αντίδρασης της PCR ήταν 50 μl. Σε κάθε αντίδραση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν ο αρνητικός μάρτυρας και ο θετικός μάρτυρας οι οποίοι περιείχαν όλα τα υλικά της PCR εκτός του εκχυλισμένου DNA. Στον αρνητικό μάρτυρα προστέθηκαν 5μl απεσταγμένου νερού (WFI, Water for injection-στείρο, απυρετογόνο H₂O, DEMO S.A.) με σκοπό τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης κατά την προετοιμασία. Ο θετικός μάρτυρας είχε 5μl ενός παλιότερου θετικού δείγματος για τη σύγκριση του με πιθανό θετικό δείγμα με σκοπό την πιστοποίηση του ως θετικό δείγμα και ταυτόχρονα ως ένδειξη της σωστής ενίσχυσης του τμήματος του *M. tuberculosis*. Η αντίδραση επώαστηκε σε κατάλληλο πρόγραμμα για την εκάστοτε αντίδραση του θερμοκυκλοποιητή (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific).

2.5.3. Ταυτοποίηση του *M. tuberculosis* Complex με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Γενικά

Μετά την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων στην καλλιέργεια είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης και ο διαχωρισμός τους από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια. Αν και οι συμβατικές τεχνικές (χρώση Zeihl-Neelsen και καλλιέργεια MGIT 960) αποτελούν μέθοδοι εκλογής στην ανίχνευση του *M.tuberculosis* Complex, έχουν χαμηλή ειδικότητα και είναι χρονοβόρες. Επομένως, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η σύντομη χρονικά και με ακρίβεια ταυτοποίηση του *M.tuberculosis* Complex. Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών είχε σημαντική επίδραση στην διάγνωση των λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια (Woods, 2001). Η PCR προσεγγίζει την ευαισθησία των συμβατικών καλλιεργειών στην ανίχνευση του *M.tuberculosis*, ωστόσο πλεονεκτεί λόγω υψηλής ειδικότητας και μειωμένου χρόνου αποτελέσματος (Sechi *et al.*, 1997, Woods, 2001, Soini *and* Musser, 2001, Nancimae *et al.*, 2002).

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 αναπτύχθηκε μια νέα διαδικασία ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού του DNA, η οποία βασίζεται στη μέθοδο PCR κινητικής φθορισμού και επιτρέπει τον προσδιορισμό των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο (Higuchi *et al.*, 1993, Gibson *et al.*, 1996). Αυτή η τεχνική υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας επιτρέπει τον προσδιορισμό των προϊόντων της PCR κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Πολύτιμο εργαλείο για την ανάπτυξη της Real-time PCR αποτέλεσαν οι ανιχνευτές. Υπάρχουν διάφοροι ανιχνευτές όπως οι ανιχνευτές υδρόλυσης ή TaqMan, η χρωστική SYBR Green I, οι ανιχνευτές υβριδοποίησης, οι μοριακοί φάροι (beacons). Στην παρούσα εργασία, η Real-time PCR που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στους ανιχνευτές υδρόλυσης.

Η πρώτη μέθοδος PCR σε πραγματικό χρόνο που έχει περιγράψει, περιλάμβανε την χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης (Heid *et al.*, 1996, Gibson *et al.*, 1996). Η τεχνική βασίζεται στη σύζευξη δυο σημαντικών διεργασιών. Πρώτον, στην κατασκευή ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών με διπλή σήμανση, οι οποίοι ονομάζονται ανιχνευτές υδρόλυσης ή TaqMan και εκπέμπουν φθορισμό κατά τη διάσπαση τους, με βάση την αρχή μεταφοράς ενέργειας

μέσω συντονισμού (Foster Resonance Energy Transfer, FRET) (Stryer, 1978, Cardullo *et al.*, 1988). Δεύτερον, στην ανακάλυψη ότι η Taq DNA πολυμεράση διαθέτει δραστικότητα 5→3' εξωνουκλεάσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποικοδόμηση του ανιχνευτή που έχει σημειωθεί με φθορισμό (Holland *et al.*, 1991).

Σήμερα, χρησιμοποιούνται κυρίως ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές οι οποίοι υβριδοποιούνται σε μια εσωτερική αλληλουχία του μορίου στόχου και δεν επεκτείνονται στο 3' άκρο του. Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια με διπλή σήμανση, δηλαδή στο ένα άκρο φέρουν μια φθορίζουσα ουσία αναφοράς (reporter) και στο άλλο άκρο μια ομάδα απορρόφησης φθορισμού (quencher) κατά αναλογία προς τα ολιγονουκλεοτίδια. Έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να υβριδοποιούνται στην αλληλουχία-στόχο μεταξύ εκκινητών, κατά τις φάσεις υβριδοποίησης και επιμήκυνσης της αντίδρασης PCR. Στην ελεύθερη άθικτη μορφή του δεν ανιχνεύεται εκπομπή φθορισμού επειδή ο φθορισμός από τη χρωστική αναφοράς απορροφάται από τη χρωστική απορρόφησης. Ωστόσο κατά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε έναν από τους κλώνου του μορίου-στόχου, ο ανιχνευτής διασπάται λόγω της δράσης 5'→3' εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Με τον τρόπο αυτό η χρωστική αναφοράς και η χρωστική απορρόφησης χωρίζονται και ο φθορισμός της χρωστικής αναφοράς δεν μεταφέρεται πλέον στη χρωστική απορρόφησης (δεν παρατηρείται φαινόμενο FRET) με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται η εκπομπή φθορισμού αναφοράς (π.χ στα 518nm για τη FAM). Η διαδικασία αυτή συμβαίνει σε κάθε κύκλο και δεν επηρεάζει την εκθετική συσσώρευση του προϊόντος της PCR. Η αύξηση του φθορισμού μετράται σε κάθε κύκλο και είναι ευθέως ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος της PCR (Heid *et al.*, 1996, Gibson *et al.*, 1996.). Εκτός από την κοινή χρωστική FAM, διατίθενται και άλλες χρωστικές με μικρή επικάλυψη στο φάσμα φθορισμού, επιτρέποντας την ταυτόχρονη παρακολούθηση της ενίσχυσης διαφορετικών στόχων DNA στην ίδια αντίδραση PCR. Ως φθορίζουσα χρωστική αναφοράς στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η 6-καρβοξυ-φλουορεσκεΐνη (FAM) για το *M. tuberculosis*, η ROX (καρβοξυ-X-ροδαμίνη) για όλα τα μυκοβακτηρίδια και η κυανίνη (CY5) για τον εσωτερικό ελεγκτή (IC, internal control).

Η Real-time PCR είναι απλούστερη, ταχύτερη και με υψηλότερη ευαισθησία μέθοδος σε σχέση με την συμβατική PCR. Χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στην ανίχνευση πολλών μικροβίων και αποδείχτηκε πολύ χρήσιμη για την ταχεία ανίχνευση και

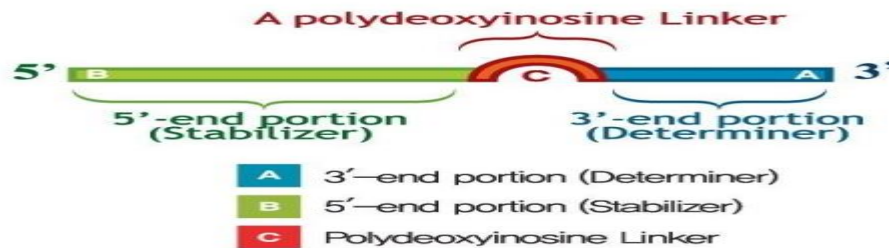
ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων, ειδικότερα του *M. tuberculosis* (Eishi, *et al.*, 2002, Bruijnestein van Coppenraet *et al.*, 2004, Lemaitre *et al.*, 2004, Miller, *et al.*, 2002, Rondini *et al.*, 2003).

Η πολλαπλή PCR είναι αποδοτική, διότι επιτρέπει την ταχύτερη ανίχνευση του μικροοργανισμού και μειώνει το κόστος των αντιδράσεων (Kraus *et al.*, 2001). Ο όρος πολλαπλή PCR πραγματικού χρόνου αναφέρεται είτε στον πολλαπλασιασμό και ανίχνευση διαφορετικών γονιδίων-στόχων σε ένα σωληνάριο είτε στη χρήση πολλαπλών φθορισμογόνων για την διάκριση διαφορετικών αλληλουχιών.

Αρχή μεθόδου

Η ανίχνευση και η διάκριση του *M.tuberculosis* Complex από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό κιτ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (Seegene). Πρόκειται για μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) με χρήση πολλαπλών εκκινητών. Η διαδικασία βασίζεται σε νέα τεχνολογία ολιγονουκλεοτιδίων διπλών εκκινητών (Dual Priming Oligonucleotide, DPO), η οποία αποτρέπει την ένωση μη ειδικών εκκινητών και είναι δομικά και λειτουργικά διαφορετικό από το σύστημα εκκινητών που βρίσκεται σήμερα σε ευρεία χρήση. Πρόκειται για εκκινητές που συντίθενται από δυο ξεχωριστές περιοχές, ένα μεγαλύτερο τμήμα στο 5'-άκρο (18-25 βάσεις), τον σταθεροποιητή (stabilizer) και ένα μικρότερο τμήμα στο 3'-άκρο (6-12 βάσεις), τον καθοριστή (determiner) τα οποία συνδέονται με μια περιοχή σύνδεσης από πολυδεοξυηνοσίνη, τον σύνδεσμο (A polydeoxyinoside Linker) (Εικόνα 2.1). Είναι γνωστό ότι η δεοξυϊνοσίνη (I) έχει σχετικά χαμηλή θερμοκρασία τήξης σε σύγκριση με τις φυσικές βάσεις, λόγω της ασθενέστερης δέσμευσης του υδρογόνου (Bergstrom *et al.*, 1997). Για αυτό το λόγο, η πολυδεοξυηνοσίνη δημιουργεί ένα σχηματισμό σαν "φούσκα" μεταξύ των δυο τμημάτων που αποτελούνται από φυσικές βάσεις και δεν μπορεί να συμμετάσχει στον υβριδισμό, αλλά χωρίζει τον εκκινητή στις δυο λειτουργικές περιοχές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμποδίζει το σχηματισμό δευτερογενών δομών και να εξαλείφει αποτελεσματικά το μη ειδικό υβριδισμό, μειώνοντας τη δημιουργία μη ειδικών προϊόντων στην PCR. Επιπλέον, η άνιση κατανομή των βάσεων των δυο λειτουργικών περιοχών οδηγεί σε διαφορετικές

προτιμήσεις για τον υβριδισμό αυτών στο DNA στόχο. Το μεγαλύτερο 5'-τμήμα συνδέεται στο DNA στόχο και εισάγει μόνο σταθερό υβριδισμό, ενώ το μικρότερο 3'-τμήμα δεσμεύεται επιλεκτικά στη θέση στόχο του και αποκλείει το μη ειδικό υβριδισμό. Επομένως, η επιμήκυνση του DNA θα πραγματοποιηθεί μόνο από το διαδοχικό επιτυχή υβριδισμό των δυο τμημάτων του DPO (Lee *et al.*, 2010, Chun *et al.*, 2007).



Εικόνα 2.1: Εκκινητής DPO (<http://www.seegene.com/technologies/dpo>)

Είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού του *M. tuberculosis* σε όλη τη διάρκεια της αντίδραση PCR. Έπειτα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν πολλά μόρια-στόχοι στην αρχή, θα χρειαστούν λίγοι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Η αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού αποτελεί άμεση συνέπεια του πολλαπλασιασμού του DNA και υπολογίζεται από το πρόγραμμα του ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το αποτέλεσμα παριστάνεται γραφικά ως μια σιγμοειδής καμπύλη.

Η ανίχνευση του *M. tuberculosis* Complex βασίζεται στην χρήση εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου MPB64 και του στοιχείου IS6110, που είναι ειδικές περιοχές του *M. tuberculosis* Complex, και του γονιδίου 16SrRNA, καθολική περιοχή όλων των βακτηριδίων, και κατ' επέκταση των άτυπων μυκοβακτηριδίων. Επίσης, το κιτ περιέχει έναν εσωτερικό μάρτυρα (IC, internal control) για τον έλεγχο της σωστής εκχύλισης του DNA και της απουσίας αναστολέων της taq πολυμεράση. Πρόκειται για πλασμιδιακό DNA, το οποίο

εισάγεται σε κάθε αντίδραση και ενισχύεται ταυτόχρονα με το DNA των δειγμάτων. Η διαδικασία εκτελέστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πειραματική διαδικασία

Η Real-time PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου Applied-Biosystem 7500 Real-time System (ThermoFisher Scientific) σε διάλυμα τελικού όγκου 20μl. Όλα τα αντιδραστήρια για την παρασκευή του μείγματος της PCR περιέχονταν στο κιτ Anyplex MTB/NTM Real-time Detection (Seegene): διάλυμα 2xAnyplex PCR master mix (ταq πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα, δεοξυριβονουκλεοτίδια, γλυκοσιδάση ουρακίλης-DNA), 10xMTB/NTM OM (τέσσερις εκκινήτες με τους αντίστοιχους τρεις ανιχνευτές) και RNase-free Water. Σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης προστέθηκαν 10μl 2xAnyplex PCR master mix, 3 μl RNase-free Water, 2 μl 10xMTB/NTM OM και 5 μl εκχυλισμένου DNA. Ο έλεγχος καθαρότητας του μείγματος αντίδρασης έγινε με τη χρήση αρνητικού μάρτυρα, στον οποίο προστέθηκαν 5 μl απεσταγμένο νερό (WFI, DEMO S.A.). Ο κατασκευαστής του εμπορικού κιτ παρείχε και θετικό μάρτυρα, δηλαδή δείγμα που περιέχει *M. tuberculosis* Complex, για τον έλεγχο σωστής παρασκευής του μείγματος αντίδρασης και εκτέλεσης ολόκληρης της αντίδρασης.

Οι συνθήκες ενίσχυσης ήταν οι εξής: αρχικά το στάδιο της παραμονής για την ενεργοποίηση της πολυμεράσης (hold) στους 95°C για 15min, στη συνέχεια επαναλαμβάνονταν 45 κύκλοι με 95°C για 30sec και 60°C για 1 λεπτό ο καθένας. Η ανίχνευση του φθορισμού έγινε στους 60°C για 60sec.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η ανίχνευση του μυκοβακτηριδίου έγινε με την εμφάνιση της σιγμοειδής καμπύλης η οποία αυξήθηκε εκθετικά και ξεπέρασε το όριο της βασικής γραμμής (threshold) που παρείχε ο κατασκευαστής. Η τιμή του φθορισμού (Ct) πρόκυπτε από το σημείο τομής της έναρξης της σιγμοειδής καμπύλης και του threshold και σχετιζόταν με την ποσότητα του μικροβιακού φορτίου. Στο ίδιο σωληνάριο παρατηρήθηκε ταυτόχρονα η ύπαρξη ή όχι *M.tuberculosis* Complex, μυκοβακτηριδίου και IC. Ο κατασκευαστής του κιτ έδινε οδηγίες για την ερμηνεία του αποτελέσματος, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2. Στην περίπτωση, όπου το Ct του εσωτερικού μάρτυρα ήταν αρνητικό, η διαδικασία έπρεπε να πραγματοποιηθεί από την αρχή.

Στόχος-ανίχνευση	Κανάλι φθορισμού	Ct	Αποτέλεσμα	Ερμηνεία
<i>M. tuberculosis</i> Complex	FAM	<40	Θετικό	Θετικό για <i>M.tuberculosis</i> Complex
Μυκοβακτηρίδια	ROX	<38	Θετικό	
Εσωτερικός μάρτυρας	CY5	<40	Θετικό	
<i>M. tuberculosis</i> Complex	FAM	<40	Θετικό	Θετικό για <i>M.tuberculosis</i> Complex
Μυκοβακτηρίδια	ROX	≥38	Αρνητικό	
Εσωτερικός μάρτυρας	CY5	<40	Θετικό	
<i>M. tuberculosis</i> Complex	FAM	≥40	Αρνητικό	Θετικό για μυκοβακτηρίδιο άλλα <u>αρνητικό για <i>M. tuberculosis</i> Complex</u>
Μυκοβακτηρίδια	ROX	<38	Θετικό	
Εσωτερικός μάρτυρας	CY5	<40	Θετικό	
<i>M. tuberculosis</i> Complex	FAM	≥40	Αρνητικό	Αρνητικό για <i>M. tuberculosis</i> Complex και για όλα τα μυκοβακτηρίδια
Μυκοβακτηρίδια	ROX	≥38	Αρνητικό	
Εσωτερικός μάρτυρας	CY5	<40	Θετικό	

Πίνακας 2.2: Ερμηνεία αποτελεσμάτων της Real-time PCR

2.5.4. Διαχωρισμός των στελεχών του *M. tuberculosis* Complex σε διάφορα είδη με πολλαπλή PCR και ανάστροφο υβριδισμό

Για διαφοροποίηση των *M.tuberculosis* Complex στελεχών στα διάφορα είδη χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κιτ GenoType Mycobacterium MTBC Ver I.X, το οποίο βασίζεται σε συνδυασμό αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ανάστροφου υβριδισμού. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται πολλαπλή PCR (multiplex PCR) ακολουθούμενη από τον ανάστροφο υβριδισμό σε ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές ακινητοποιημένους σε μεμβράνη. Το GenoType MTBC περιέχει ειδικά ζευγάρια βιοτινιλιωμένων εκκινητών για να ενισχύουν ταυτόχρονα περιοχές του γονιδίου 23SrRNA, του γονιδίου *gyrB* και της RD1 περιοχής με πολλαπλή PCR για τη διαφοροποίηση-διάκριση του *Mycobacterium tuberculosis* Complex στα ακόλουθα είδη ή υποείδη: *M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. bovis ssp. bovis*, *M. bovis ssp. caprae*, *M. microti* και *M. tuberculosis/M. canettii*.

Αρχή μεθόδου

Η πολλαπλή PCR περιγράφηκε πρώτη φορά το 1988 (*Chamberlain et al.*, 1988) και είναι μια παραλλαγή της PCR, με την οποία επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιοχών. Η ταχύτερη και πιο οικονομική πολλαπλή PCR έχει παρόμοια ειδικότητα και ευαισθησία με την απλή PCR, άλλα δείχνει μεγαλύτερη ευελιξία στο σχεδιασμό των εκκινητών και των συνθηκών αντίδρασης της PCR. Μια προσέγγιση είναι η χρήση βιοτυλιωμένων εκκινητών ανά πολλαπλασιαζόμενη περιοχή, όπως ήταν αυτοί των δυο εμπορικών διαθέσιμων κιτ. Η βιοτυνιλίωση συμβάλει στην πρόσδεση τμημάτων σε επιφάνειες. Η βιοτίνη δεν παρεμποδίζει τις χημικές και βιολογικές λειτουργίες του DNA, συνδέεται ισχυρά και με μεγάλη επιλεκτικότητα με την στρεπταβιδίνη γεγονός που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στον εντοπισμό αλλά και την προσκόλληση του βιοτυνυλιωμένου τμήματος του γονιδίου σε επιφάνειες καλυμμένες με στρεπταβιδίνη.

Ο ανάστροφος υβριδισμός βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να αποδιατάσσεται. Κάθε μόριο DNA περιέχει πολλά ζεύγη βάσεων, ώστε υπό φυσιολογικές συνθήκες οι συμπληρωματικές αλυσίδες μιας διπλής έλικας να μην διαχωρίζονται ποτέ αυθόρμητα. Το 1961 (*Schildkraut et al.*, 1961) αποδείχθηκε ότι οι δυο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA μπορούν να αποχωριστούν με θερμότητα σε αλκαλικό περιβάλλον, σχηματίζοντας δυο μονόκλινα μόρια. Οι δυο αλυσίδες αποδιατάσσονται πλήρως όταν σπάσουν όλοι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων ($A = T, G \equiv C$).

Ο όρος αποδιάταξη γενικά υποδηλώνει ότι η φυσική διαμόρφωση ενός μακρομορίου έχει μετατραπεί σε κάποια άλλη μορφή. Η θερμοκρασία στην οποία έχουν αποδιαταχθεί τα μισά από τα μόρια DNA ενός δείγματος ονομάζεται θερμοκρασία τήξης. Η τιμή εξαρτάται από την περιεκτικότητα των βάσεων G-C. Επειδή κάθε ζεύγος G-C συνδέεται με τρεις δεσμούς υδρογόνου, είναι σταθερότερο από ένα ζεύγος A-T, το οποίο συνδέεται με δυο δεσμούς υδρογόνου. Όσα περισσότερα ζεύγη G-C περιέχει ένα μόριο DNA τόσο περισσότερη ενέργεια απαιτείται για την αποδιάταξη των δυο αλυσίδων του (*Watson et al.*, 2007). Μετά την αποδιάταξη, τα μονόκλινα τμήματα που είναι συμπληρωματικά έχουν την τάση να δημιουργούν υβρίδια. Με τον όρο υβριδοποίηση χαρακτηρίζουμε το ζευγάρωμα δυο μονόκλωνων μορίων DNA ή RNA, ή μονόκλωνων αλυσίδων DNA με μονόκλωνες αλυσίδες RNA. Αποτελεί από τις πιο χρήσιμες τεχνικές της

μοριακής βιολογίας. Επίσης η τεχνική αυτή μπορεί να επεκταθεί επιτρέποντας την αλληλεπίδραση οποιωνδήποτε συμπληρωματικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων και τη δημιουργία δίκλωνης δομής. Οι τεχνικές υβριδοποίησης με ιχνηθέτες DNA, είναι οι πρώτες ιστορικά τεχνικές που στηρίζονται στα νουκλεϊκά οξέα για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα (Drake *et al.*, 1987, Musial *et al.*, 1988). Ο όρος *ανάστροφος* χρησιμοποιείται γιατί οι ανιχνευτές είναι σταθεροποιημένοι σε μια μεμβράνη και όχι στα προϊόντα της PCR και επιπλέον σημαίνονται τα προϊόντα της PCR και όχι οι ανιχνευτές.

Η μεθοδολογία είναι η ίδια και τα δυο εμπορικά διαθέσιμα κιτ. Αρχικά γίνεται μια αντίδραση πολλαπλής PCR με βιοτινυλιωμένους εκκινητές για να ενισχυθούν περιοχές συμπληρωματικές των ανιχνευτών. Αυτοί οι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές βρίσκονται ακινητοποιημένοι ως παράλληλες γραμμές σε μια ταινία νιτροκυτταρίνης. Στην συνέχεια τα προϊόντα της PCR αναδιατάσσονται χημικά σε αλκαλικό περιβάλλον σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για να ακολουθήσει υβριδισμός των μονόκλωνων τμημάτων με τους ανιχνευτές. Η εξαιρετικά ειδική δέσμευση των συμπληρωματικών κλώνων DNA διασφαλίζεται από τις αυστηρές συνθήκες που προκύπτουν από το συνδυασμό ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος και μιας ορισμένης θερμοκρασία. Εν συνεχεία προστίθεται στρεπταβιδίνη σημασμένη με αλκαλική φωσφατάση και δεσμεύεται με τα προηγούμενως σχηματισμένα βιοτινυλιωμένα υβρίδια. Η επώαση με χρωμογόνο έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρώματος.

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ο οποίος παρείχε όλα τα αντιδραστήρια για την πολλαπλή PCR και τον ανάστροφο υβριδισμό. Τα αντιδραστήρια του κιτ Genotype MTBC Ver I.X (Hain Lifescience) ήταν το AM-A GT MTBC Ver I.X, το οποίο περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα, δεοξυνουκλεοτίδια, taq πολυμεράση και το AM-B GT MTBC Ver I.X, το οποίο αποτελείτο από πολλαπλούς ειδικούς βιοτυλιωμένους εκκινητές για την ανίχνευση του κάθε είδους, άλατα και χρωστική. Το πρωτόκολλο της PCR για ένα δείγμα είναι το εξής: 35 μ L από το διάλυμα AM-B GT MTBC Ver I.X και 10 μ L από το διάλυμα AM-A GT MTBC Ver I.X. Η ποσότητα μείγματος της αντίδρασης ήταν πολλαπλάσια του αριθμού των δειγμάτων, συνυπολογίζοντας δυο

επιπλέον δείγματα αυτά του αρνητικού και του θετικού μάρτυρα της αντίδρασης. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν 50 μL , το οποίο περιείχε 45 μL μείγματος αντίδρασης και 5 μL κάθε δείγματος. Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific), της οποίας οι συνθήκες κυκλοποίησης αναγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα 2.3:

Θερμοκρασία -Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95°C για 5min	1 κύκλος
95°C για 30sec	10 κύκλοι
58°C για 2 min	
95°C για 25sec	20 κύκλοι
53°C για 40sec	
70°C για 40sec	
70°C για 8 min	1 κύκλος

Πίνακας 2.3: Συνθήκες κυκλοποίησης του GenoType Mycobacterium MTBC Ver I.X

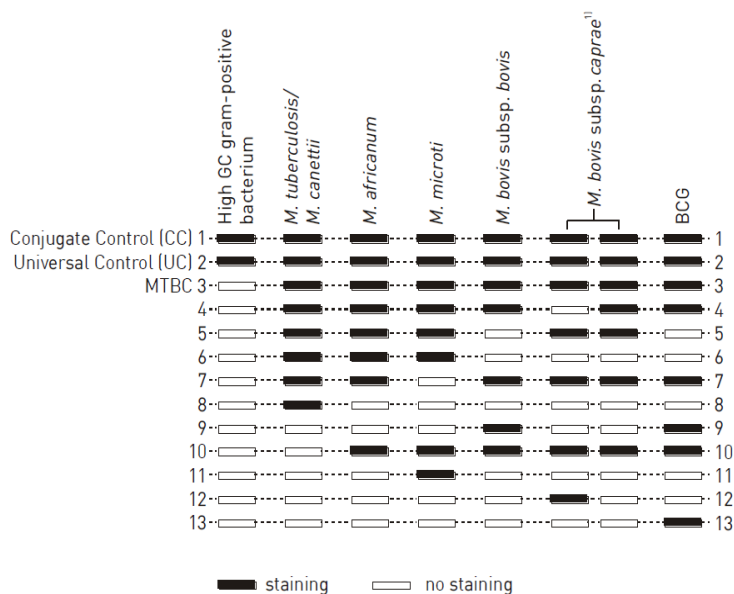
Τα ενισχυμένα προϊόντα των PCR ηλεκτροφορήθηκαν για την επιβεβαίωση της ενίσχυσης των γονιδίων, πριν την διαδικασία του ανάστροφου υβριδισμού. Τα στάδια του ανάστροφου υβριδισμού πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα TwinCubator (Hain Lifescience). Πρόκειται για έναν αναδευτήρα με δυνατότητα ρύθμισης συγκεκριμένης θερμοκρασίας και ταχύτητας ανάδευσης, στον οποίο τοποθετούνται ειδικές πλάκες των 12 θέσεων (πηγαδάκια κατάλληλα για την προσθήκη ταινιών νιτροκυτταρίνης).

Αρχικά, έγινε προθέρμανση του διαλύματος υβριδισμού, HYB (Hybridization Buffer) και του διαλύματος ισχυρής πλύσης STR (Stringent Wash Solution) στους 37°C, καθώς και αρίθμηση των ταινιών νιτροκυτταρίνης με μολύβι στο κενό σημείο. Σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας στην άκρη των βυθισμάτων έγινε καλή ανάμειξη 20 μL διαλύματος αποδιάταξης, DEN (Denaturation Solution) και 20 μL προϊόντος της PCR και επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί χημική αποδιάταξη των προϊόντων της ενίσχυσης. Εν συνεχεία, προστέθηκε 1 mL διαλύματος υβριδισμού, HYB (Hybridization Buffer) και μια ταινία νιτροκυτταρίνης (strip), τα οποία ανακινηθήκαν ήπια και επώαστηκαν στους 45°C για 30 λεπτά. Ήταν αναγκαία η τοποθέτηση ολόκληρης της ταινίας στο διάλυμα, γιατί σε αυτό το στάδιο έγινε υβριδοποίηση των μονόκλωνων

αλυσίδων με τους συμπληρωματικούς ιχνηθέτες που ήταν ακινητοποιημένοι στην ταινία. Οι ιχνηθέτες ήταν ειδικοί για την διαφοροποίηση των MTBC στελεχών (MTBC Ver I.X STRIPS). Σε σωληνάριο τύπου falcon των 50ml παρασκευάστηκε διάλυμα σύζευξης, αναμειγνύοντας τα διαλύματα Conjugate Concentrate (CON-C) και ρυθμιστικό διάλυμα σύζευξης, CON-D (Conjugate Buffer) σε αναλογία 1:100. Το τελικό διάλυμα σύζευξης περιείχε τη στρεπταβιδίνη σημασμένη με αλκαλική φωσφατάση, η οποία δεσμεύτηκε με τα βιοτινυλιωμένα υβρίδια ανιχνευτή-εκκινητή. Απορρίφθηκε το διάλυμα υβριδισμού και ακολούθησε πλύσιμο των ταινιών νιτροκυτταρίνης με την προσθήκη 1mL διαλύματος ισχυρής πλύσης, STR (Stringent Wash Solution), ανάδευση και επώαση στους 45°C για 15 λεπτά. Έπειτα, έγινε απόρριψη του STR και προσθήκη πλυστικού διαλύματος RIN (Rinse Solution) για 1 λεπτό για απομάκρυνση των μη υβριδοποιημένων αλυσίδων. Μετά την απομάκρυνση του RIN, προστέθηκε 1mL του προπαρασκευασμένου διαλύματος σύζευξης, το οποίο αναδεύτηκε και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα υποστρώματος, αναμειγνύοντας τα διαλύματα, SUB-C (Substrate Concentrate) και το ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος SUB-D (Substrate Buffer) σε αναλογία 1:100 σε σωληνάριο τύπου falcon των 50ml. Το τελικό διάλυμα υποστρώματος περιείχε το υπόστρωμα, το οποίο κατέλυε το ένζυμο και παρήγαγε χρώμα. Απομακρύνθηκε το διάλυμα σύζευξης και έγινε πλύσιμο των ταινιών με προσθήκη 1 mL διαλύματος πλύσης RIN (Rinse Solution), ακολουθώντας ήπια ανάδευση και επώαση για 1 λεπτό. Ακολούθησε απόρριψη και επανάληψη της διαδικασίας μια φορά με διάλυμα πλύσης RIN και άλλη μια με απεσταγμένο νερό (WFI, DEMO S.A.). Έπειτα από την απομάκρυνση του απεσταγμένου νερού, προστέθηκε 1ml του προπαρασκευασμένου διαλύματος υποστρώματος και επώαστηκε για 5 λεπτά σε σκοτάδι και χωρίς ανάδευση. Στην ταινία νιτροκυτταρίνης εμφανίστηκαν παράλληλες χρωματισμένες γραμμές στις περιοχές όπου είχε προηγηθεί σύζευξη ανιχνευτών και βιοτυλιωμένων εκκινητών. Τέλος, αφαιρέθηκε το διάλυμα υποστρώματος και προστέθηκε 1ml απεσταγμένου νερού (WFI, DEMO S.A.) για τη διακοπή της αντίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα. Οι χρωματισμένες γραμμές της ταινίας νιτροκυτταρίνης συγκρίθηκαν με ένα υπόδειγμα του κατασκευαστή (Hain Lifescience) και ερμηνεύτηκαν.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων του kit Genotype MTBC

Στην ταινία υβριδισμού MTBC υπήρχαν 13 ακινητοποιημένοι ανιχνευτές ως παράλληλες γραμμές. Οι τρεις πρώτες γραμμές αποτελούσαν ελεγκτές της διαδικασίας. Η πρώτη γραμμή ήταν ο Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC), ο οποίος ήταν δείκτης της πρόσδεσης του ενζύμου στο υβριδοποιημένο μόριο εκκινητή-ανιχνευτή και της αντίδρασης του υποστρώματος με το ένζυμο προς παραγωγή χρώματος. Η εμφάνιση της πιστοποιούσε την σωστή διεκπεραίωση του υβριδισμού. Η δεύτερη γραμμή ήταν ο Γενικός Μάρτυρας (Universal Control, UC), ο οποίος ήταν δείκτης όλων των μυκοβακτηριδίων και κάποιων Gram θετικών βακτηριών με υψηλό ποσοστό G+C. Η τρίτη γραμμή ήταν ο ειδικός ανιχνευτής των MTBC Ver I.X (MTBC - specific probe), ο οποίος ήταν δείκτης όλων των ειδών του *M.tuberculosis* Complex. Οι υπόλοιπες γραμμές από την 4^η έως την 13^η ήταν ειδικοί ανιχνευτές χαρακτηριστικών περιοχών του γονιδιώματος του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης, οι οποίοι σε συνδυασμό ταυτοποιούσαν το είδος του (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Διάγραμμα ερμηνείας αποτελεσμάτων του GenoType Mycobacterium MTBC Ver I.X (Πηγή: Εγχειρίδιο GenoType Mycobacterium MTBC)

2.6 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του *M. tuberculosis* Complex

Πριν τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιφυματικά έγινε έλεγχος καθαρότητας της καλλιέργειας και ταυτοποίηση ότι επρόκειτο για στέλεχος *M. tuberculosis*. Ο έλεγχος καθαρότητας πραγματοποιήθηκε με ανακαλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ (bioMérieux), θρεπτικό υλικό κατάλληλο για την ανάπτυξη των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, και επώαστηκε για 48 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Η ταυτοποίηση είχε προηγηθεί με την μέθοδο της Real-time PCR (ενότητα 2.7). Ως ευαίσθητος μάρτυρας (susceptible control) στις τρεις μεθόδους ευαισθησίας, που περιγράφονται παρακάτω, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294). Να σημειωθεί ότι ο έλεγχος ευαισθησίας στην πυραζιναμίδη δύναται να πραγματοποιηθεί μόνο με τη μέθοδο σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960. Οι άλλες δυο μέθοδοι αποτυγχάνουν στον έλεγχο ευαισθησίας στην πυραζιναμίδη και για αυτό έχει απορριφθεί η χρήση τους.

Σημαντικό σημείο για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του *M. tuberculosis* Complex είναι ο ορισμός των ορίων ευαισθησίας (breakpoints), τα οποία καθορίζουν την ευαισθησία και την ανθεκτικότητα των στελεχών στα διάφορα αντιφυματικά. Σύμφωνα με το CLSI (CLSI, M24-A, 2011) δεν υπάρχει κάποια καθολικά αποδεκτή μέθοδος αναφοράς για την τιμή MIC αν και χρησιμοποιούνται αρκετές τεχνικές προσδιορισμού ευαισθησίας του *M. tuberculosis* Complex. Τα όρια ευαισθησίας (breakpoints) του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης βασίστηκαν κυρίως σε πειραματικά δεδομένα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μέσα καλλιέργειας, τεχνικές και αντιβιοτικά. Στελέχη που δεν μπορούν να αναπτυχθούν στην “κρίσιμη συγκέντρωση” (critical concentration) χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα, S ενώ στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά, R. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι σε στελέχη άγριου τύπου, υπάρχει ένα ποσοστό (περίπου 1%) ανθεκτικών στελεχών. Οι τεχνικές προσδιορισμού της ευαισθησίας του *M. tuberculosis* που χρησιμοποιούνται σήμερα εξετάζουν είτε μόνο την κρίσιμη συγκέντρωση είτε ταυτόχρονα την κρίσιμη συγκέντρωση και το κρίσιμο ποσοστό, όπως η μέθοδος σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960. Ουσιαστικά, η κρίσιμη συγκέντρωση καθορίζεται πειραματικά με σύγκριση της ανάπτυξης άγριου τύπου έναντι «μη» άγριου τύπου στελεχών.

Για αυτό το λόγο, στις περισσότερες μεθόδους προσδιορισμού της ευαισθησίας του *M. tuberculosis* (π.χ. μέθοδος E-test και μέθοδος μικροαραιώσεων) χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ευαισθησίας τα επιδημιολογικά όρια (Epidemiological cut-off, ECOFF). Η τιμή του ECOFF βασίζεται στη καμπύλη κανονικής κατανομής ή καμπύλη του Gauss (Gaussian distribution) που προκύπτει από τις MIC των διαφόρων εργαστηρίων που χρησιμοποίησαν την ίδια *in vitro* μέθοδο για το συγκεκριμένο αντιφυματικό. Εξ ορισμού, το ECOFF είναι η υψηλότερη τιμή MIC για μικροοργανισμούς χωρίς ανιχνεύσιμη αντοχή (κατανομή άγριου τύπου, wild-type distribution) δηλαδή χωρίς επίκτητο ή μεταλλακτικό μηχανισμό αντοχής. Το ECOFF είναι δείκτης με βιολογική και επιδημιολογική αξία, καθώς πρόκειται για ένα σταθερό μέγεθος και συμμετέχει στον έλεγχο ανάπτυξης αντοχής ανιχνεύοντας εγκαίρως μικροοργανισμούς με νέους μηχανισμούς αντοχής. Αποτελεί ακρογωνιαίος λίθο για τον καθορισμό ορίων ευαισθησίας, αλλά δεν έχει χρησιμοποιηθεί συστηματικά για το καθορισμό αυτών στο *M. tuberculosis*.

2.6.1 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του *M. tuberculosis* Complex σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960

Αρχή μεθόδου

Ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών *M. tuberculosis* Complex στα πρώτης γραμμής αντιφυματικά φάρμακα (ριφαμπικίνη, ισονιαζίδη, πυραζιναμίδη, αιθαμβουτόλη) και δεύτερης γραμμής (στρεπτομυκίνη) πραγματοποιήθηκε με το σύστημα Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) για το Antimicrobial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* (AST SIRE System BBL, Becton Dickinson). Πρόκειται για ποιοτική μέθοδο διάρκειας 4-13 ημερών, όπου χρησιμοποιείται μια συγκέντρωση από κάθε αντιβιοτικό σε σωληνάρια υγρής φάσης MGIT με φθορίζοντα δείκτη στον πυθμένα τους. Η αρχή της μεθόδου είναι ίδια με την καλλιέργεια των μυκοβακτηριδίων σε υγρό θρεπτικό υλικό MGIT 960, η οποία έχει περιγραφεί στην αντίστοιχη ενότητα 2.4.1. Η ανάπτυξη του στελέχους όπως προαναφέρθηκε ανιχνεύεται από την ποσότητα του φθορισμού. Αν το στέλεχος αναπτυχθεί στο αντίστοιχο φιαλίδιο με το αντιβιοτικό, ο δείκτης φθορίζει (διότι μειώνεται η συγκέντρωση του O₂ στο φιαλίδιο) και το στέλεχος

αναφέρεται ως ανθεκτικό. Η ανάπτυξη συγκρίνεται με ένα σωληνάριο που δεν περιέχει φάρμακο (Μάρτυρας Ανάπτυξης). Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI, 2011 και του κατασκευαστή του εμπορικού κιτ BACTEC MGIT 960 SIRE Kit για τα αντιφυματικά ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, αιθαμβουτόλη και στρεπτομυκίνη, ενώ για την πυραζιναμίδη το εμπορικό κιτ BACTEC MGIT 960 PZA Kit. Το BACTEC MGIT 960 SIRE Kit περιέχει ένα φιαλίδιο από τα αντιφυματικά: στρεπτομυκίνη (332 µg), ισονιαζίδη (33.2 µg), ριφαμπικίνη (332 µg) και αιθαμβουτόλη (1660 µg) σε λυοφιλιωμένη μορφή και επίσης οκτώ φιαλίδια συμπλήρωμα SIRE supplement (20 ml Middlebrook εμπλουτισμένο με ολεϊκό οξύ 0.6 g (oleic acid), αλβουμίνη 50 g (albumin), δεξτρόζη 20 g (dextrose) και καταλάση 0.03g (catalase).

Πειραματική διαδικασία

Τα αντιφυματικά φάρμακα στα οποία πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας είναι η ισονιαζίδη, η στρεπτομυκίνη, η ριφαμπικίνη, η αιθαμβουτόλη και η πυραζιναμίδη. Το εμπορικό κιτ προσέφερε φιαλίδια που περιείχαν σε λυοφιλιωμένη μορφή το εκάστοτε αντιβιοτικό (Becton Dickinson). Γι' αυτό, έγινε ανασύσταση των λυοφιλιωμένων αντιβιοτικών με στείρο απεσταγμένο νερό (WFI, DEMO S.A.) για να δημιουργηθεί η απαιτούμενη τελική συγκέντρωση στο καθένα, όπως περιγράφονται στον Πίνακα 2.4.

Λυοφιλιωμένο αντιβιοτικό		Ποσότητα νερού που προστίθεται	Συγκέντρωση αντιβιοτικού
Ισονιαζίδη	INH (0.1) (Χαμηλή συγκέντρωση)	4 mL	8.3 µg/mL
	INH (0.4) (Υψηλή συγκέντρωση)	2 mL	33.2 µg/mL
Στρεπτομυκίνη	STR (1.0) (Χαμηλή συγκέντρωση)	4 mL	83µg/mL
	STR (4.0) (Υψηλή συγκέντρωση)	2 mL	332µg/mL
Αιθαμβουτόλη	EMB (0.1) (Χαμηλή συγκέντρωση)	4 mL	415 µg/mL
	EMB (7.5) (Υψηλή συγκέντρωση)	2 mL	622,5 µg/mL
Ριφαμπικίνη	RIF (1)	4 mL	83 µg/mL
Πυραζιναμίδη	PZA (100)	2.5 mL	8000 µg/mL

Πίνακας 2.4: Ανασύσταση αντιφυματικών φαρμάκων και τελική συγκέντρωση για τον έλεγχο ευαισθησίας σε θρεπτικό υγρό MGIT 96

Τα δείγματα προέρχονταν από σωληνάρια υγρού μέσου καλλιέργειας MGIT στα οποία είχε αναπτυχθεί *M. tuberculosis* της ημέρας 1 (επόμενη μέρα της αρχικής ανίχνευσης θετικότητας από τα μηχανήματα BACTEC MGIT 960) μέχρι την πέμπτη μέρα και παρασκευάζονταν εναιώρημα ζυμού MGIT για τους επακόλουθους ενοφθαλμισμούς.

Αρχικά, σημάνθηκαν οχτώ νέα σωληνάρια MGIT (7ml) (Becton Dickinson) για κάθε εξεταζόμενο απομονωμένο στέλεχος: 1^ο ως Μάρτυρας Ανάπτυξης (GC), 2^ο ως STR 1.0, 3^ο ως STR 4.0, 4^ο ως INH 0.1, 5^ο ως INH 0.4, 6^ο ως RIF, 7^ο ως EMB 5.0 και 8^ο ως EMB 7.5. Έπειτα στο καθένα από αυτά προστέθηκαν άσηπτα 800μL Supplement BACTEC MGIT SIRE (Becton Dickinson) και 100μL από το αντίστοιχο ανασυσταμένο αντιβιοτικό. Για την πυραζιναμίδη ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία άλλα χρησιμοποιήθηκε ειδικό σωληνάριο BACEC MGIT 960 PZA (Becton Dickinson). Έτσι, οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στα φιαλίδια MGIT ήταν: STR(1.0)=1 mg/mL, STR(4.0)=4 mg/mL, INH(0.1)= 0,1 mg/mL, INH(0.4)= 0,4 mg/mL, RIF= 1 mg/mL, EMB(5.0) = 5 mg/mL, EMB(7.5) = 7,5 mg/mL και PZA=100 mg/mL. Σε καθένα από αυτά τα σωληνάρια μεταφέρθηκαν 0,5 mL εναιωρήματος του στελέχους *M. tuberculosis*, από θετικό σωληνάριο υγρού μέσου καλλιέργειας MGIT. Για την παρασκευή του μάρτυρα ανάπτυξης (GC) έγινε αραίωση 1:100 αυτού με μεταφορά 0,1mL εναιωρήματος του στελέχους σε 10mL στείρου αλατούχου διαλύματος (0.9% NaCl) και ακολούθησε καλή ανάμειξη. Εμβολιάστηκαν 0,5ml αυτού στο σωληνάριο MGIT του μάρτυρα ανάπτυξης. Τα σωληνάρια εισήχθησαν στο μηχανήματα MGIT 960 (Bactec MGIT, BBL, Becton Dickinson) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιβεβαιώθηκε ότι η σειρά των σωληναρίων στο σύστημα ήταν η σωστή και αντιστοιχούσε στην σωστή θέση. Η επώαση των δειγμάτων διήρκησε 4-13 ημέρες. Το μηχανήματα μετά το τέλος της επώασης παρουσίασε τα αποτελέσματα ευαισθησίας για κάθε αντιβιοτικό του στελέχους. Συγκεκριμένα, το μηχανήματα ανέφερε για το εκάστοτε συγκεκριμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικό τον όρο «ευαισθησία (S)», όταν δεν υπήρξε ανάπτυξη του *M.tuberculosis* Complex και «αντοχή (R)» στις περιπτώσεις ανάπτυξης αυτού. Όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση τα κριτήρια της CLSI (CLSI, M24-A, 2011) με κρίσιμη συγκέντρωση για το χαρακτηρισμό του στελέχους ως ανθεκτικό για το κάθε αντιφυματικό την εξής: ισονιαζίδη $\geq 0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$, ριφαμπικίνη ≥ 1

μg/ ml, αιθαμβουτόλη ≥ 5 μg/ ml, πυραζιναμίδη ≥ 100 μg/ ml, στρεπτομυκίνη ≥ 1 μg/ ml. Στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη έχουν τιμή $\geq 0,1$ μg/ ml και $< 0,4$ μg/ ml, ενώ με υψηλού επιπέδου αντοχή έχουν τιμή $\geq 0,4$ μg/ ml. Ομοίως, στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην στρεπτομυκίνη έχουν τιμή ≥ 1 μg/ ml και < 4 μg/ ml, ενώ με υψηλού επιπέδου αντοχή έχουν τιμή ≥ 4 μg/ ml.

Για έλεγχο βακτηριακής επιμόλυνσης εμβολιάστηκε 0,1mL από το εναιώρημα του στελέχους σε αιματούχο άγαρ (bioMérieux), τυλίχθηκε με παραφίνη το τρυβλίο και επώαστηκε για 48 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

2.6.2 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του *M. tuberculosis* Complex με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H10

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδο μικροαραιώσεων σε υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H10 πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας του αντιφυματικού (MIC, Minimal Inhibitory Concentration) των στελεχών στα πρώτης γραμμής (INH, RIF, ETH) και δεύτερης γραμμής (STR) αντιφυματικά. Η πυραζιναμίδη δεν εμπεριέχεται στην πλάκα μικροαραιώσεων, αφού η συγκεκριμένη μέθοδος οδηγεί σε εσφαλμένα αποτελέσματα ευαισθησίας του συγκεκριμένου αντιφυματικού. Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιβιοτικού (MIC) ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που θα αναστείλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο θρεπτικό υλικό (άγαρ) και θα αποτρέψει την ορατή ανάπτυξη του. Η τιμή της MIC θεωρείται κριτήριο αναφοράς για να ορισθεί η ευαισθησία ενός μικροοργανισμού.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικές πλάκες (Sensititre MycoTB plates) των 96-βοθρίων με ενσωματωμένα σε λυοφιλιμένη μορφή δώδεκα αντιφυματικά διαφόρων συγκεντρώσεων (TREK Diagnostic Systems). Τα δώδεκα αντιμικροβιακά που περιέχονται στην πλάκα είναι η ισονιαζίδη, η στρεπτομυκίνη, η αιθαμβουτόλη, η ριφαμπικίνη, η οφλοξασίνη, η μοξιφλοξασίνη, η αμικασίνη, η ριφαμπουτίνη, η αιθιοναμίδη, το παρα-αμινοσαλικυλικό οξύ, η κυκλοσερίνη και η καναμυκίνη. Ο κατασκευαστής (TREK

Diagnostic Systems) μαζί με τις πλάκες (Sensititre MycoTB plates) παρέχει το διάλυμα για το εναιώρημα των κυττάρων (saline-Tween) και το υγρό θρεπτικό υλικό Middlebrook 7H9 εμπλουτισμένο με OADC, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου. Τα όρια ανίχνευσης των MIC για το κάθε αντιφυματικό είναι τα εξής: ισονιαζίδη 0,03-4 µg/ml, ριφαμπικίνη 0,12-16 µg/ml, αιθαμβουτόλη 0,5-32 µg/ml και στρεπτομυκίνη 0,25-32 µg/ml.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI, 2011 και του κατασκευαστή του εμπορικού κιτ Sensititre MycoTB για τα αντιφυματικά ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, αιθαμβουτόλη και στρεπτομυκίνη. Η ανασταλτική συγκέντρωση των υπολοίπων αντιβιοτικών της πλάκας (οφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη, αμικασίνη, ριφαμπουτίνη, αιθιοναμίδη, παρα-αμινοσαλικυλικό οξύ, κυκλοσερίνη, καναμυκίνη) δεν ελέγχθηκαν στην παρούσα εργασία. Επιπλέον, με την συγκεκριμένη μέθοδο δεν ελέγχθηκε η πυραζιναμίδη διότι δεν περιέχεται στην πλάκα.

Απαραίτητο στάδιο για την επίτευξη της μεθόδου ήταν η καλλιέργεια το *M.tuberculosis* σε μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H11. Είναι στερεό θρεπτικό μέσο με βάση το άγαρ. Σε αυτό περιέχεται ποικιλία ανόργανων αλάτων με ουσίες απαραίτητες για την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων, όπως θειικό μαγνήσιο, κιτρικό σιδηρο (iii) αμμώνιο, κιτρικό νάτριο, θειικό αμμώνιο, θειικός ψευδάργυρος, θειικός χαλκός, γλουταμικό μονονάτριο, φωσφορικό δινάτριο, φωσφορικό μονοκάλιο, χλωριούχο νάτριο, γλυκόζη, γλυκερόλη, βόεια αλβουμίνη v, καταλάση, πυριδοξίνη, βιοτίνη, χλωριούχο ασβέστιο, άγαρ, πράσινο του μαλαχίτη και ελαϊκό οξύ δημιουργώντας pH $6,6 \pm 0,2$ (Yamane *et al.*, 1996, Saito, 1998, Leung *et al.*, 2012). Το κιτρικό νάτριο, όταν μετατρέπεται σε κιτρικό οξύ, χρησιμεύει για τη συγκράτηση ορισμένων ανόργανων κατιόντων στο διάλυμα. Η γλυκερόλη είναι μια πλούσια πηγή άνθρακα και ενέργειας. Το ελαϊκό οξύ, καθώς και άλλα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν από τους βακίλους της φυματίωσης και διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των μυκοβακτηριδίων. Η καταλάση καταστρέφει τα τοξικά υπεροξειδία που ενδέχεται να υπάρχουν στο υλικό καλλιέργειας. Η πρωτογενής επίδραση της αλβουμίνης είναι η προστασία των βακίλων της φυματίωσης από τοξικούς παράγοντες και, επομένως, ενισχύει την ανάκτησή τους σε πρωτογενή απομόνωση. Μερική αναστολή των

μολυσματικών βακτηριδίων επιτυγχάνεται με την παρουσία της χρωστικής πράσινου του μαλαχίτη.

Πειραματική διαδικασία

Πριν τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιφυματικά πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια του στελέχους από «θετικά» σωληνάρια MGIT σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό άγαρ Middlebrook 7H10 (Becton, Dickinson), το οποίο τυλίχθηκε με παραφίνη και επώαστηκε για 48-72 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Με βαμβακοφόρο στυλέο λήφθηκαν αποικίες από το τρυβλίο Middlebrook 7H10, προστέθηκαν σε διάλυμα saline-Tween που περιείχε γυάλινες μπίλιες (Trek Diagnostic Systems), παρέμειναν για 15-30 λεπτά σε ηρεμία και παρασκευάστηκε μικροβιακό εναιώρημα θολερότητας 0.5 της κλίμακας McFarland.

Σε στείρες συνθήκες στο υγρό θρεπτικό υλικό Middlebrook 7H9 εμπλουτισμένο με OADC μεταφέρθηκαν 100μL του εναιωρήματος, αναμείχτηκαν καλά για 20 δευτερόλεπτα και μεταφέρθηκαν 100μL στα βοθρία της MycoTB πλάκας (TREK Diagnostic Systems). Η πλάκα καλύφθηκε και σφραγιστική με ειδικό σταθερό πλαστικό διάφανο αυτοκόλλητο καπάκι παρεχόμενο από την εταιρεία και επώαστηκε για 21 ημέρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Ταυτόχρονα διεξήχθη έλεγχος καθαρότητας του εναιωρήματος, καλλιεργώντας 50μl από το τελικό Middlebrook 7H9 σε αιματούχο άγαρ (bioMérieux) και 50μl σε Middlebrook 7H10 άγαρ (Becton, Dickinson). Τα τρυβλία τυλίχθηκαν με παραφίνη και επώαστηκαν για 48 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂, όπου ελέγχθηκαν για επιμόλυνση.

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω της μεθόδου ανεστραμμένου καθρέφτη, όπου αντανακλάται το είδωλο του πυθμένα της πλάκας στον καθρέφτη, και με τη βοήθεια εκπομπής φωτός από λάμπα στην επιφάνεια της πλάκας σε σκοτεινό θάλαμο. Το διάβασμα της πλάκας έγινε στις 7, 10, 14 και 21 μέρες επώασης. Ως τιμή του MIC δόθηκε η συγκέντρωση το πρώτου βοθρίου που περιέχει αντιβιοτικό απουσίας αποικιών την 21^η ημέρα. Όπως προαναφέρθηκε, η επιλογή των ανθεκτικών στελεχών έγινε βάση του ECOFF και η τιμή MIC για το κάθε αντιφυματικό είναι η εξής: ισονιαζίδη $\geq 0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$, ριφαμπικίνη $\geq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$, αιθαμβουτόλη $\geq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ και στρεπτομυκίνη $\geq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$

2.6.3 Προσδιορισμός της ευαισθησίας του *M. tuberculosis* Complex με ταινίες διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test) σε στερεό θρεπτικό υλικό

Αρχή μεθόδου

Για την επιβεβαίωση της αντοχής των στελεχών στα πρώτης γραμμής αντιφυματικά (INH, RIF, ETH) και δεύτερης γραμμής (STR) εφαρμόστηκε η μέθοδος E-test, η οποία προσδιόριζε την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του αντιφυματικού (MIC). Ουσιαστικά, ο προσδιορισμός της MIC γίνεται με συνδυασμό δύο μεθόδων: τη μέθοδο διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ και τη μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ, οι οποίες αποτελούν αρχή της μεθόδου E-test. Η συγκεκριμένη μέθοδος αδυνατεί στον προσδιορισμό ευαισθησίας στην πυραζιναμίδα για αυτό και δεν χρησιμοποιήθηκε για αυτό το αντιφυματικό φάρμακο.

Για πρώτη φορά, το E-test αξιολογήθηκε από τους Wanger and Mills ως ταχεία μέθοδος για τον έλεγχο ευαισθησίας του *M. tuberculosis* (Wanger and Mills, 1996). Έκτοτε, διάφορες μελέτες προτείνουν τις ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού ως εναλλακτική μέθοδο για τη μελέτη της ευαισθησίας του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης στα αντιφυματικά φάρμακα (Joloba *et al*, 2000, Sanchez *et al.*, 1999, Akcali *et al.*, 2005, CLSI 2011). Το E-test είναι μια πλαστική ταινία χωρίς πόρους διαστάσεων 0.5 mm X 6 mm που περιλαμβάνει σε σειρά αυξανόμενες διαδοχικές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού. Συγκεκριμένα, είναι υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιβιοτικού αντιπροσωπευτικές των αντίστοιχων θεραπευτικών συγκεντρώσεων. Αυτό συμβαίνει διότι οι τιμές της MIC στο E-test ορίζονται από μια προκαθορισμένη και συνεχή σταθερά συγκέντρωσης του αντιβιοτικού.

Η ταινία E-test τοποθετείται στο τρυβλίο στο οποίο έχει ενοφθαλμιστεί το προς διερεύνηση στέλεχος του μικροοργανισμού. Στην πλευρά της ταινίας που εφάπτεται στο θρεπτικό υλικό είναι προσροφημένο το αντιβιοτικό σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε διαδοχικές θέσεις και στην εμπρόσθια πλευρά της ταινίας αναγράφεται σε $\mu\text{g/ml}$ στην αντίστοιχη θέση η αντίστοιχη συγκέντρωση. Με βάση τις τιμές MIC για το εκάστοτε αντιβιοτικό τα στελέχη *M. tuberculosis* χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα (S, sensitive), όταν η αντιμικροβιακή δραστηριότητα συνδέεται με πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας και ως

ανθεκτικά (R, resistance), όταν η αντιμικροβιακή δράση συνδέεται με υψηλότερη από την αναμενόμενη πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας.

Για την επιτυχή ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης χρησιμοποιήθηκαν κατά την προετοιμασία του εναιωρήματος σε υγρό θρεπτικό υλικό Middlebrook 7H9, tween 80 και γλυκερόλη. Το Tween 80 (ή αλλιώς πολυσορβικό 80, διάλυμα πολυοξυαιθυλενικού μονοεστέρα σορβιτάνης με ελαϊκό οξύ) διευκολύνει την ανάπτυξη του *M.tuberculosis* επιτρέποντας στις ουσίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του να εισέλθουν πιο αποτελεσματικά στο μυκοβακτηριακό κύτταρο. Η γλυκερόλη είναι η προτιμώμενη πηγή ενέργειας και άνθρακα για το *M. tuberculosis in vitro* (Pethe *et al.*, 2010, Long 1922).

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, για βέλτιστα αποτελέσματα στην ανάπτυξη του *M.tuberculosis*, έγινε προσθήκη 0.5% tween80 (Becton Dickinson) και 2% γλυκερόλη (Thermo Scientific) στο υγρό θρεπτικό υλικό Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), το οποίο περιείχε γυάλινες μπίλιες (glass beads). Σε 3ml του εμπλουτισμένου υγρού θρεπτικού υλικού Middlebrook 7H9 ενοφθαλμίστηκαν αποικίες από το στερεό θρεπτικό υλικό Lowenstein-Jensen, έγινε έντονη ανάδευση σε συσκευή vortex (BE 101V, BICASA) για 3 - 5 λεπτά και παραμονή για 30 λεπτά σε ηρεμία ώστε να γίνει καθίζηση των μεγάλων σωματιδίων. Το υπερκείμενο ρυθμίστηκε περίπου σε θολερότητας 3 της κλίμακας McFarland. Για κάθε στέλεχος, το εναιώρημα αυτό καλλιεργήθηκε σε πέντε τρυβλία με Middlebrook 7H11 άγαρ εμπλουτισμένο με 10% OADC. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό, η επίστρωση έγινε προς τρεις διευθύνσεις με περιστροφή του τρυβλίου κάθε φορά κατά 60°, καλύπτοντας ολόκληρη την επιφάνεια με παράλληλες συνεχείς γραμμές από την μία άκρη του τρυβλίου στην άλλη και στο τέλος, κυκλικά στην περιφέρεια του τρυβλίου, κοντά στο τοίχωμά του. Σκοπός ήταν να κατανομηθεί ομοιόμορφα το μικροβιακό εναιώρημα σε όλο το τρυβλίο και να υπάρξει συρρέουσα ανάπτυξη του μυκοβακτηριδίου Τα πέντε τρυβλία αντιστοιχούν το πρώτο στο μάρτυρα ανάπτυξης (τρυβλίο χωρίς αντιβιοτικό) και τα υπόλοιπα τέσσερα το καθένα σε ένα από τα τέσσερα αντιφυματικά (ισονιαζίδη, στρεπτομυκίνη, αιθαμβουτόλη και ριφαμπικίνη). Μετά

τον ενοφθαλμισμό, τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Οι ταινίες E-test περιέχουν αντιφυματικά διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης από 0,016 έως 256 µg/ml για ισονιαζίδη (IZ) (bioMerieux), αιθαμβουτόλη (EB) (bioMerieux) και για στρεπτομυκίνη (SM) (bioMerieux), και από 0,002 έως 32 µg/ml για ριφαμπικίνη (RI) (bioMerieux). Μετά την επώαση, με λαβίδα τοποθετήθηκε στο κέντρο του εκάστοτε τρυβλίου μια ειδική ταινία E-test του αντίστοιχου αντιβιοτικού, το τρυβλίο τυλίχθηκε με παραφίνη για να αποφευχθεί η αποξήρανση του θεραπευτικού υλικού και επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες για 10 ημέρες. Ωστόσο, από την 3^η ημέρα έως την 10^η ημέρα γινόταν καθημερινός έλεγχος της ανάπτυξης του μυκοβακτηριδίου και της δημιουργίας ζώνης αναστολής, η οποία είναι ελλειπτικού σχήματος. Συγκεκριμένα, στο σημείο διασταύρωσης των αποικιών με την ταινία σταματά ένα συμμετρικό σχήμα έλλειψης το οποίο αντιστοιχεί στην ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού (MIC). Την ημέρα που παρατηρήθηκε το επιθυμητό αποτέλεσμα καταγράφηκε η αντίστοιχη MIC. Ωστόσο, η επώαση και η καταγραφή των MIC συνεχίστηκε μέχρι την 10^η ημέρα. Ως τιμή του MIC δόθηκε η συγκέντρωση που καταγράφηκε την 10^η ημέρα.

Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν σύμφωνα με το ECOFF και την κρίσιμη συγκέντρωση που χρησιμοποιεί το CLSI, 2011 στη μέθοδο αναλογιών (agar proportion) σε Middlebrook 7H10, ορίζοντας την τιμή της MIC (σε µg/mL) και χαρακτηρίζοντας ανθεκτικό ή ευαίσθητο ένα στέλεχος. Ως ανθεκτικά προσδιορίστηκαν τα στελέχη με τιμή MIC για το εκάστοτε αντιμικροβιακό φάρμακο την εξής: ισονιαζίδη $\geq 0,25$ µg/ml, ριφαμπικίνη ≥ 1 µg/ml, αιθαμβουτόλη ≥ 5 µg/ml και στρεπτομυκίνη ≥ 2 µg/ml.

2.7. Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα αντιφυματικά

2.7.1 Ανίχνευση μεταλλάξεων με πολλαπλή PCR και ανάστροφο υβριδισμό

Το kit Genotype MTBDRplus Ver 2.0 είναι μια εμπορική διαδικασία η οποία ανιχνεύει μεταλλάξεις των πιο κοινών γονιδίων αντοχής της ισονιαζίδης (*katG* και *inhA*)

και της ριφαμπικίνης (*rpoB*). Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού και στην πολλαπλή PCR, που περιγράφηκαν στην ενότητα 2.5.4.

Όπως προαναφέρθηκε, στο γενικό μέρος, η ισονιαζίδη δρα ενεργοποιώντας την καταλάση και συνδέεται με την ενυλο-ACP ρεδουκτάση, γι' αυτό μεταλλάξεις στο *katG* γονίδιο και στον υποκινητή του *inhA* γονιδίου αντίστοιχα, επιβεβαιώνουν αντοχή σε αυτή. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* βρίσκονται σε στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή, ενώ στον υποκινητή του *inhA* σε στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή. Όσον αφορά την ριφαμπικίνη, δρα και αναστέλλει την RNA πολυμεράση των βακτηριακών κύτταρων μέσω δέσμευσης της στη βήτα-υπομονάδα της πολυμεράσης με αποτέλεσμα μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpoB* προσδίδουν αντοχή σε αυτή.

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ο οποίος παρέιχε όλα τα αντιδραστήρια για την πολλαπλή PCR και τον ανάστροφο υβριδισμό. Σε γενικές γραμμές, η σύσταση των αντιδραστηρίων, το πρωτόκολλο της PCR και του ανάστροφου υβριδισμού είναι ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο kit Genotype MTBC Ver I.X (Hain Lifescience).

Όσον αφορά την διαδικασία της PCR, χρησιμοποιήθηκε το kit Genotype MTBDRplus Ver 2.0 (Hain Lifescience) που περιείχε τα αντιδραστήρια AM-A GT MTBDRplus Ver 2.0 και AM-B GT MTBDRplus Ver 2.0. Η διαφορά εντοπίζεται στη σύσταση του αντιδραστηρίου AM-B GT MTBDRplus Ver 2.0 που περιείχε βιοτυλιωμένους εκκινητές του για την ανίχνευση των συχνότερων μεταλλάξεων συγκεκριμένων περιοχών των γονιδίων *rpoB*, *katG* και *inhA* των *M. tuberculosis* στελεχών. Μια άλλη διαφορά εντοπίζεται στις συνθήκες κυκλοποίησης, οι οποίες αναγράφονται στον ακόλουθο Πίνακα 2.5.

Θερμοκρασία -Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95°C για 5min	1 κύκλος
95°C για 30sec	10 κύκλοι
58°C για 2 min	
95°C για 25sec	20 κύκλοι
53°C για 40sec	
70°C για 40sec	
70°C για 8 min	1 κύκλος

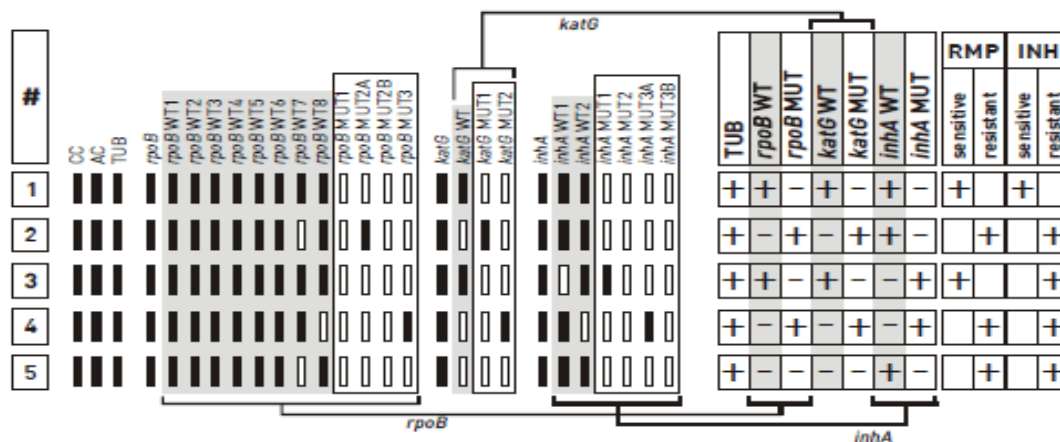
Πίνακας 2.5: Συνθήκες κυκλοποίησης του kit Genotype MTBDRplus Ver 2.0

Όσον αφορά τη διαδικασία του υβριδισμού η μόνη διαφορά είναι οι ταινίες νιτροκυτταρίνης οι οποίες που έφεραν ανιχνευτές ειδικούς για την εύρεση μεταλλάξεων συγκεκριμένων περιοχών των γονιδίων *rpoB*, *katG* και *inhA* των *M. tuberculosis* στελεχών (MTBDRplus Ver 2.0 STRIPS).

Ερμηνεία αποτελεσμάτων του κιτ Genotype MTBDRplus

Στην ταινία υβριδισμού MTBDRplus Ver 2.0 υπήρχαν 27 ακινητοποιημένοι ανιχνευτές ως παράλληλες γραμμές. Οι τρεις πρώτες ζώνες ήταν δείκτες ορθής διεκπεραίωσης της διαδικασίας. Η πρώτη ζώνη ήταν ο Μάρτυρας Σύζευξης (Conjugate Control, CC), ο οποίος ήταν δείκτης τη αποδοτικότητας της σύνδεσης του ενζύμου και της αντίδρασης του υποστρώματος. Η δεύτερη ζώνη ήταν ο Μάρτυρας Ενίσχυσης (Amplification Control, AC), ήταν η ένδειξη ύπαρξης ενισχυμένων τμημάτων DNA. Η τρίτη γραμμή ήταν ο Μάρτυρας *M.tuberculosis* Complex (TUB), ο οποίος ήταν δείκτη ύπαρξης κάποιου είδους του *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Οι υπόλοιπες γραμμές από την 4^η έως την 24^η ήταν ανιχνευτές των της ύπαρξης ή όχι μεταλλαγών του εκάστοτε γονιδίου. Το *rpoB* γονίδιο ανιχνεύτηκε από την 4^η έως την 15^η γραμμή. Η 4^η γραμμή ανίχνευσε τη περιοχή του *rpoB* γονιδίου που κωδικοποιεί τα κωδικόνια 505 έως 533. Σε περίπτωση απουσίας μεταλλαγών ανιχνεύτηκαν οι οχτώ γραμμές (5^η-12^η) ονομαζόμενες ως ανιχνευτής *rpoB* άγριου-τύπου 1-8 (*rpoB* WT1 έως *rpoB* WT8). Σε περίπτωση αντοχής στην ριφαμπικίνη, συνεπαγόταν ύπαρξη μεταλλαγών και κατ' επέκταση εμφάνιση μιας εκ των τεσσάρων γραμμών (13^η-15^η), που ονομάζονταν ανιχνευτής *rpoB* μετάλλαξης 1, 2A, 2B 3 (*rpoB* MUT) συνδυαστικά με επτά από τις οχτώ γραμμές άγριου τύπου. Ανιχνευτές του *katG* γονιδίου ήταν οι γραμμές 16^η έως 19^η. Η 16^η γραμμή ήταν ανιχνευτής της περιοχής του του *katG* γονιδίου που κωδικοποιεί το κωδικόνιο 315. Η 17^η γραμμή ήταν ανιχνευτής *katG* άγριου-τύπου (*katG* WT) και εμφανίστηκε απουσίας μεταλλαγών. Σε περιπτώσεις κυρίως υψηλού επίπεδου αντοχής στην ισονιαζίδη παρουσιάστηκε είτε η 18^η γραμμή είτε η 19^η γραμμή, οι οποίες ήταν οι ανιχνευτές μετάλλαξης *katG* 1 ή 2 (*katG* MUT1 ή *katG* MUT1). Οι γραμμές 20^η έως 26^η ανίχνευαν τις θέσεις -15 και -17 του υποκινητή του *inhA* γονιδίου. Η 20^η γραμμή ήλεγχε την περιοχή του *inhA* γονιδίου, οι γραμμές 21^η και 22^η, οι οποίες ήταν ανιχνευτές *inhA* άγριου τύπου (*inhA* WT) εμφανιστήκαν σε περίπτωση

απουσίας μεταλλαγών. Σε περιπτώσεις ύπαρξης μετάλλαξης παρουσιάστηκε κάποια από την 23^η μέχρι 26^η γραμμή, το όνομα των οποίων ήταν ανιχνευτής μετάλλαξης *inhA* 1, 2, 3A, 3B (*inhA* MUT). Σε χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη εμφανίστηκε συνδυασμός μιας γραμμής *inhA* άγριου τύπου και μιας ανιχνευτή μεταλλάξεων (Εικόνα 2.3). Στον Πίνακα 2.6 παρουσιάζεται και η αντιστοιχία μετάλλαξης των γραμμών-ανιχνευτών για τα γονίδια *rpoB*, *katG* και *inhA*.



Εικόνα 2.3: Διάγραμμα ερμηνείας αποτελεσμάτων του GenoType MTBDRplus Ver 2.0 (Πηγή: Εγχειρίδιο GenoType MTBDRplus Ver 2.0)

Γονίδιο	Όνομα γραμμής	Μετάλλαξη	Αντικατάσταση βάσης	Αντικατάσταση αμινοξέος
<i>rpoB</i>	MUT1	D516V	GAC → GTC	Hsp → Val
	MUT2A	H526Y	GAC → TAC	His → Tyr
	MUT2B	H526D	CAC → GAC	His → Asp
	MUT3	S531L	TCG → TGG	Ser → Leu
<i>katG</i>	MUT1	S315T1	AGC → ACC	Ser → Thr
	MUT2	S315T2	AGC → AGA	Ser → Thr
<i>inhA</i>	MUT1	C-15T		
	MUT2	A-16G		
	MUT3A	T-8C		
	MUT3B	T-8A		

Πίνακας 2.6: Αντιστοιχία ονόματος γραμμής-ανιχνευτή με μετάλλαξη για το κάθε γονίδιο *rpoB*, *katG*, *inhA* του κιτ GenoType MTBDRplus Ver 2.0

2.7.2 Ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα 1ης και 2ης γραμμής

Για τον ενίσχυση των γονιδίων που σχετίζονται με αντόχη στα αντιφυματικά φάρμακα πρώτης (ριφαμπικίνη, ισονιαζίδη, πυραζιναμίδη, αιθαμβουτόλη) και δεύτερης γραμμής (στρεπτομυκίνη) εφαρμόστηκε η μοριακή μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ακολούθησε ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των παραγόμενων προϊόντων. Χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα εκκινήτων που στοχεύουν σε γενετικούς τόπους σχετιζόμενους με αντοχή. Το πρωτόκολλο του μείγματος της αντίδρασης περιγράφεται στην ενότητα 2.5.2. Οι συνθήκες κυκλοποίησης στον θερμοκυκλοποιητή (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific) ήταν ίδιες για όλα τα γονίδια με εξαίρεση την θερμοκρασία του υβριδισμού, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 2.7.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	5 min	94°C	1
Αποδιάταξη	1 min	94°C	35
Υβριδισμός	1 min	*	
Επιμήκυνση	80 sec	72°C	
Τελική επιμήκυνση	10 min	72°C	1

* Η θερμοκρασία υβριδισμού για κάθε γονίδιο αναγράφεται στους πίνακες που ακολουθούν με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των εκκινήτων και το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων (bp).

Πίνακας 2.7: Συνθήκες κυκλοποίησης για τα γονίδια αντοχής στα αντιφυματικά 1^{ης} και 2^{ης} γραμμής

Μετά την ενίσχυση, ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτική αγαρόζη 2% για 30-40 λεπτά.

2.7.3 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην ισονιαζίδη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αντοχή στην ισονιαζίδη των *M.tuberculosis* Complex σχετίζεται με μεταλλάξεις στα είκοσι δυο δομικά γονίδια *katG*, *inhA*, *ahpC*, *mabA*, *nat*, *mshA*, *iniA*, *iniB*, *iniC*, *Rv0340*, *ndh*, *furA*, *aacD6*, *srmR* homolog, *oxyR*, *efpA*, *kasA*, *fbpC*, *fabD*, *Rv1592c*, *Rv1772*, *fadE24*, στην διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* και στον υποκινητή του γονιδίου *inhA*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των είκοσι τεσσάρων περιοχών για έλεγχο μεταλλάξεων, η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR και το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.8.

Περιοχή	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Θερμοκρασία υβριδισμού	Βιβλιογραφική αναφορά
inhA	<i>inhA3F</i> <i>inhA4R</i>	5'-AGGTCGCCGGGGTGGTCAGC-3' 5'-AGCGCCTTGGCCATCGAAGCA-3'	517 bp	65°C	Machado <i>et al.</i> , 2013
	<i>inhA3F</i> <i>inhA5R</i>	5'-CCACATCTCGGCGTATTTCG-3' 5'-TTCCGGTCCGCCGAACGACAG-3'	501 bp	65°C	Machado <i>et al.</i> , 2013
mabA- inhA	<i>mabA-inhAF</i> <i>mabA-inhAZR</i>	5'-TTCGTAGGGCGTCAATACAC-3' 5'-TAACCAGAATCCGTTTGCC-3'	998 bp	62°C	<u>Σχεδιασμός για την παρούσα εργασία</u>
katG	<i>katGF</i> <i>katGR</i>	5'-TTTCGGCGCATGGCCATGA-3' 5'-ACAGCCACCGAGCAGCAG-3'	894 bp	65°C	Haas <i>et al.</i> , 1997
	<i>katG1F</i> <i>katG1zR</i>	5'-GCCCGATAACACCAACTCCTG-3' 5'-AAAGTGTGACCGCCGACGAT-3'	846 bp	68°C	<u>Σχεδιασμός για την παρούσα εργασία</u>
	<i>katG3F</i> <i>katG3R</i>	5'-GAGGAATTGGCCGACGAGTT-3' 5'-TCTCAGGGGCACTGAGCGTAA-3'	667 bp	68°C	Jagielski <i>et al.</i> , 2014
	<i>katG4F</i> <i>katG4R</i>	5'-GCCGAGTACATGCTGCTCGAC-3' 5'-CGGGGGTTGTGGTTGA-3'	452 bp	64°C	Jagielski <i>et al.</i> , 2014
oxyR- ahpC	<i>ahpF</i> <i>ahpR</i>	5'-ACCACTGCTTTGCCGCCACC-3' 5'-CCGATGAGAGCGGTGAGCTG-3'	236 bp	64°C	Telenti <i>et al.</i> , 1997
oxyR	<i>oxyRF</i> <i>oxyRR</i>	5'-GGTGATATATCACACCATA-3' 5'-CTATGCGATCAGGCGTACTTG-3'	528 bp	55°C	Sreevatsan <i>et al.</i> , 1997
ahpC	<i>ahpCF</i> <i>ahpCR</i>	5'-AGCGACTTCACGGCAGCATG-3' 5'-TGATGTCTTTGGCGTACTCG-3'	732 bp	65°C	Jagielski <i>et al.</i> , 2014
ndh	<i>ndhF</i> <i>ndhR</i>	5'-CAGCTGGGTGCGATGGTCAC-3' 5'-GGTACCCGGGAATGGACAGG-3'	213 bp	63°C	Rindi <i>et al.</i> , 2005
ndh	<i>ndh2F</i> <i>ndh2R</i>	5'-CATTCCCGGGTACCCGAAC-3' 5'-GTCGACCGTTTTGGCGTTGG-3'	535 bp	62.5°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
	<i>ndh1zF</i> <i>ndhR</i>	5'-ATCACCACCGCCGCTGAAG-3' 5'-GGTACCCGGGAATGGACAGG-3'	1127 bp	65°C	<u>Σχεδιασμός για την παρούσα εργασία</u>
furA	<i>furAF</i> <i>furAR</i>	5'-GCGATCGGGTCCTAGCAG-3' 5'-TTCATATGACCCACGACGG-3'	641 bp	65°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
Rv0340	<i>Rv0340F</i> <i>Rv0340R</i>	5'-ATGCGTCGTATGCTTGG-3' 5'-CCAAACACCTATCGGGATC-3'	850 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003

Περιοχή	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Θερμοκρασία υβριδισμού	Βιβλιογραφική αναφορά
iniB	<i>iniBF</i> <i>iniBR</i>	5'-ATAAGTTCCGGACCGGCG-3' 5'-CGACAGATGAGGCATAGCAG-3'	1053 bp	58°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
iniB-<i>iniA</i>	<i>iniB-<i>iniAF</i></i> <i>iniB-<i>iniAR</i></i>	5'-TTGAACGGCGTGCTATG-3' 5'-GTGCTGATGTCATCGACGG-3'	1070 bp	65°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
iniA	<i>iniAF</i> <i>iniAR</i>	5'-CAACCGCAGCGTTGACAT-3' 5'-CCGCATGCCGATAATCATT-3'	1079 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
iniA-<i>iniC</i>	<i>iniA-<i>iniCF</i></i> <i>iniA-<i>iniCR</i></i>	5'-GGAATCGAAACCGCTGCG-3' 5'-CCAGCCCACCGATCTGTTTGA-3'	1090 bp	65°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
iniC	<i>iniCF</i> <i>iniCR</i>	5'-TCCTGTTGCGCACCTGAAC-3' 5'-AACATGTTCCACCGGTGGC-3'	1040 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>fadE24</i>	<i>fadE24F</i> <i>fadE24R</i>	5'-GCTATCAGATGCCGTCGCG-3' 5'-GTGGGATCGAATAGTGGCTG-3'	890 bp	64°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>fbpC</i>	<i>fbpCF</i> <i>fbpCR</i>	5'-GCATGGGTCTCTCCTCTG-3' 5'-GCTGATACCAGTCGGTGTAG-3'	635 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>efpA</i>	<i>efpAF</i> <i>efpAR</i>	5'-ACCTCCCGCGATCATCG-3' 5'-CGTCGAGCTTCATCCGTTTC-3'	810 bp	61°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>fabD</i>	<i>fabDF</i> <i>fabDR</i>	5'-AAAAACATAGCTTACAGGCCCG-3' 5'-GTTGTGTACAAATCGAACTGACG-3'	1071 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>srmR</i> <i>homolog</i>	<i>srmR homolog1F</i> <i>srmR homolog1R</i>	5'-GCCAGTACCGGATCGACG-3' 5'-GTGTCGCGGACATCCTGG-3'	819 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
	<i>srmR homolog2F</i> <i>srmR homolog2R</i>	5'-CCAGGATGTCCGCGACACC-3' 5'-TGTCGCGGTGCGAGCAAC-3'	835 bp	61°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>accD6</i>	<i>accD6_1F</i> <i>accD6_1R</i>	5'-GACAGGAGACCTGCGATGAC-3' 5'-GGCAGAACAAATCCGACCA-3'	655 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
	<i>accD6_2F</i> <i>accD6_2R</i>	5'-CGGTTGGTCCGATTGTTTC-3' 5'-CCTCGCGCGTGGCATTCTG-3'	842 bp	64°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>Rv1592c</i>	<i>Rv1592c_1F</i> <i>Rv1592c_1R</i>	5'-AACTCGGCGTACCCAACC-3' 5'-ACACGCTCGGAATTC AAGG-3'	804 bp	63°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
	<i>Rv1592c_2F</i> <i>Rv1592c_2R</i>	5'-GAGCGTGTCCGGTTGTCC-3' 5'-CGAGGTTGTGTGCCAGGTC-3'	843 bp	64°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>Rv1772</i>	<i>Rv1772F</i> <i>Rv1772R</i>	5'-CGGGTGTCTCAACGAC-3' 5'-GGACTGGACTCGCTGATTG-3'	633 bp	64°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003
<i>kasA</i>	<i>kasAF</i> <i>kasAR</i>	5'-GTTCAGGCGAGGCTTGAG-3' 5'-GCGATGTCTGCTCAGTAA-3'	1293 bp	61°C	Garbe <i>et al.</i> , 1996
<i>mshA</i>	<i>msh5A</i> <i>msh6as</i>	5'-GCGTGTCACTTCGGTTCCTGC-3' 5'-CACCGGGATGGACCACGTCG-3'	749 bp	58°C	Brossier <i>et al.</i> , 2011
	<i>mshA11s</i> <i>mshA12as</i>	5'-GGCCGCCGTGAAGAACGCGG-3' 5'-CAGCTCGACGATCAGCGCGG-3'	1020 bp	62°C	Brossier <i>et al.</i> , 2011
<i>nat</i>	<i>nhoAF</i> <i>nhoAR</i>	5'-GCTATCTCGTCGACGTCG-3' 5'-GCATTCTACGTCTACGCCG-3'	662 bp	61°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2003

Πίνακας 2.8: Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων ανοχής στην ισονιαζίδη

2.7.4 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην ριφαμπικίνη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *rpoB* σχετίζεται με την αντοχή των *M. tuberculosis* Complex στελεχών στη ριφαμπικίνη. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *rpoB*, η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR και το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 2.9.

Περιοχή	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Θερμοκρασία υβριδισμού	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>rpoB</i>	<i>rpoB-F</i> <i>rpoB-R</i>	5'- CCG CGA TCA AGG AGT TCT TC -3' 5'-ACA CGA TCT CGT CGC TAA CC-3'	315 bp	64°C	Sekiguchi <i>et al.</i> , 2007

Πίνακας 2.9: Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στη ριφαμπικίνη

2.7.5 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην αιθαμβουτόλη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *embB*, *Rv0340*, *iniA*, *iniB*, *iniC* σχετίζονται με αντοχή στην αιθαμβουτόλη. Οι αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων *Rv0340*, *iniA*, *iniB*, *iniC* παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.8. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αυτών των τριών γονιδίων, η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR και το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 2.10.

Περιοχή	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Θερμοκρασία υβριδισμού	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>embB</i>	<i>embBF</i> <i>embBR</i>	5'-CGACGCCGTGGTGATATTCG-3' 5'-CCACGCTGGGAATTCGCTTG-3'	863 bp	58°C	Bakula <i>et al.</i> , 2013
	<i>embB2F</i> <i>embB2R</i>	5'-GGCTGATGGGCGTCATCT-3' 5'-GGACCAGCCGTTGGAGTAGGTC-3'	497 bp	62°C	Bakula <i>et al.</i> , 2013
	<i>embB3F</i> <i>embB3R</i>	5'-CCCGACCTACTCCAACGGC-3' 5'-TGGTGCATACCGAGCAGCAT-3'	1195 bp	62°C	Ramaswamy <i>et al.</i> , 2000

Πίνακας 2.10: Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στην αιθαμβουτόλη

2.7.6 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην πυραζιναμίδα

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρουσία μεταλλάξεων στα τρία γονίδια *pncA*, *panD* και *rpsA* σχετίζονται με αντοχή στην πυραζιναμίδα. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αυτών των τριών γονιδίων, η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR και το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 2.11.

Περιοχή	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Θερμοκρασία υβριδισμού	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>pncA</i>	<i>pncA-F</i> <i>pncA-R</i>	5'-GGCGTCATGGACCCTATATC-3' 5'-CAACAGTTCATCCCGGTTTC-3'	670 bp	55°C	Sekiguchi <i>et al.</i> , 2007
<i>panD</i>	<i>panDF</i> <i>panDR</i>	5'-TCAACGGTTCGGTTCGGCTGCT-3' 5'-TATCCGCCACTGCTGCACGACCTT-3'	650 bp	55°C	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>rpsA</i>	<i>rpsA1F(-129)</i> <i>rpsA1R(+854)</i>	5'-CGATTTTTCCGCCCTGAGTTC-3' 5'-CGCCACGGGTCTTCCTGAGTC-3'	983 bp	55°C	Feuerriegel <i>et al.</i> , 2013
	<i>rpsA2F(+645)</i> <i>rpsA2R(+1588)</i>	5'-CGTGTCTCGATCGTCAACTTC-3' 5'-GACCACTTCACGCGCCAACACATC-3'	943 bp	60°C	Feuerriegel <i>et al.</i> , 2013

Πίνακας 2.11: Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στην πυραζιναμίδα

2.7.7 Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην στρεπτομυκίνη

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρουσία μεταλλάξεων στα τρία γονίδια *rpsL*, *rrs* και *rpsL* σχετίζονται με αντοχή στην στρεπτομυκίνη. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αυτών των τριών γονιδίων, η θερμοκρασία υβριδισμού της αντίδρασης PCR και το μέγεθος του προϊόντος σε ζεύγη βάσεων παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 2.12.

Περιοχή	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών	Μέγεθος προϊόντος	Θερμοκρασία υβριδισμού	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>rpsL</i>	<i>rpsLF</i> <i>rpsLR</i>	5'-CCAACCATCCAGCAGCTGGT-3' 5'-GTCGAGAGCCCGCTTGAGGG-3'	572 bp	64°C	Sekiguchi <i>et al.</i> , 2007
<i>gidB</i>	<i>gidB1</i> <i>gidB2</i>	5'-GTCCTCCACTCGCCATC-3' 5'-GCGGAGTGCCTAATGTCTC-3'	675 bp	63°C	Spies <i>et al.</i> , 2008
<i>rrs</i>	<i>rrs290F</i> <i>rrs290R</i>	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3'	1042 bp	63°C	Sirgel <i>et al.</i> , 2012
	<i>rrs2F</i> <i>rrs2R</i>	5'-CGTGTCTCGATCGTCAACTTC-3' 5'-GACCACTTCACGCGCCAACACATC-3'	675 bp	63°C	Sreevatsan <i>et al.</i> , 1996

Πίνακας 2.12: Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στην στρεπτομυκίνη

2.7.8. Ηλεκτροφόρηση

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

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA κινείται μέσα σε πορώδες πηκτή αγαρόζης συγκεκριμένης συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση εξαρτάται από το μέγεθος σε ζεύγη βάσεων των προϊόντων της PCR που πρόκειται να διαχωριστούν. Το αρνητικά φορτισμένο DNA μετακινείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται γρηγορότερα από τα βαρύτερα. Η χρήση φθορίζουσας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) κάνει ορατό το τμήμα DNA με την εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Το EtBr παρεμβάλλεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια και φθορίζει όταν διεγείρεται με UV. Για τον προσδιορισμό του μήκους σε ζεύγη βάσεων του τμήματος DNA που ενισχύθηκε με την PCR χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (DNA ladder). Ο μάρτυρας μοριακού βάρους επιλέγεται βάσει του μέγεθος των προϊόντων της PCR που πρόκειται να διαχωριστούν. Κάθε δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί αναμειγνύεται με μικρή ποσότητα χρωστικής βρωμοφαινόλης, το ονομαζόμενο διάλυμα φόρτωσης (loading dye) και τοποθετείται στις θέσεις υποδοχής (βοθρία) του πηκτώματος. Η χρωστική καθιστά τα δείγματα ορατά για την εύκολη τοποθέτηση τους στα βοθρία του πηκτώματος και βαρύτερα ώστε να καθιζάνουν στα βοθρία.

Στην συγκεκριμένη εργασία τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης 2%, διότι είναι καταλληλότερο για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA

(100bp έως >30kb) καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους μεταξύ των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα προϊόντα της PCR της μεθόδου MIRU-VNTR που ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης Nu-Sieve 3% (ThermoFisher Scientific). Η αγαρόζη Nu-Sieve παρέχει τη δυνατότητα ηλεκτροφόρησης τμημάτων DNA μικρού μεγέθους (10bp έως 1000bp) και διαχωρισμού τμημάτων με μικρή διαφορά μεγέθους (10bp) μεταξύ τους.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, έγινε παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE: σε κωνική φιάλη του 1mL, προστέθηκαν σε 900 ml απεσταγμένου νερού (WFI, DEMO S.A.) και 100 mL 10X TBE (Invitrogen). Έπειτα, σε κωνική φιάλη των 250mL διαλύθηκαν 2g αγαρόζης (UltraPure Agarose, Invitrogen) σε 100 mL διαλύματος 1xTBE για παρασκευή πηκτής αγαρόζης με συγκέντρωση 2% ή 3g αγαρόζης Nu-Sieve στην περίπτωση της πηκτής αγαρόζης με συγκέντρωση 3%. Ακολούθησε θέρμανση στους 100°C σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5 λεπτά για να διαλυθεί η αγαρόζη. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης μέχρι να μειωθεί η θερμοκρασία του διαλύματος περίπου στους 55°C, ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό ειδικό εκμαγείο της ηλεκτροφόρησης. Εν συνεχεία, προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (UltraPure™ Ethidium Bromide, Invitrogen) σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Σε ειδικό δοχείο σχήματος τετραγώνου ή ορθογωνίου τοποθετήθηκαν τα εκμαγεία των δειγμάτων ηλεκτροφόρησης ή αλλιώς «χτενάκια» για να δημιουργηθούν θέσεις υποδοχής (βοθρία) για το φόρτωμα των δειγμάτων, προστέθηκε προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης, το οποίο χρειάστηκε 30 λεπτών για να πήξει. Η πήξη της αγαρόζης επιτυγχάνεται με την πτώση της θερμοκρασίας της. Αφαιρέθηκαν τα εκμαγεία και εμβαπτίστηκε το πηκτή στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1X TBE. Κάθε δείγμα DNA ποσότητας 5µl τοποθετήθηκε στα πηγαδάκια του πηκτώματος αφού αναμείχθηκε με 1µl διαλύματος φόρτωσης (6X DNA Loading Dye Solution, Fermentas) και σε ξεχωριστό βοθρίο προστέθηκε ο μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (GeneRuler 100bp DNA Ladder, Fermentas). Εφαρμόστηκε σταθερή ηλεκτρική τάση 120V για 20-30 λεπτά από το τροφοδοτικό (Owl EC300XL2 Compact Power Supply, Thermo SCIENTIFIC). Τέλος, εκτέθηκε το πηκτώμα σε ακτινοβολία UV (MiniBisPro, Bio-

Imaging Systems) και μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή έγιναν τα διάφορα τμήματα DNA, προϊόντα στην PCR.

2.7.9. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα της PCR των γονιδίων σχετιζόμενων με αντοχή στα αντιφυματικά φάρμακα (ενότητα 2.7.2 έως 2.7.7) και των οχτώ γονιδίων της μεθόδου MST (ενότητα 2.8.1) υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση (sequencing). Για την εκτέλεση της αλληλούχησης είναι απαραίτητη η χρήση καθαρού DNA απουσία ουσιών που αναστέλλουν την δράση της DNA πολυμεράσης. Οι ουσίες που πρέπει να απομακρυνθούν είναι υπολείμματα εκκινητών, ελεύθερων δεοξυνουκλεοτιδίων, αλάτων, ρυθμιστικού διαλύματος και ανεπιθύμητων νουκλεϊών προϊόντων, προκειμένου τα αποτελέσματα να έχουν όσο το δυνατόν λιγότερο θόρυβο υποβάθρου (background noise) και ως εκ τούτου, να είναι αξιόπιστα. Ως θόρυβος ορίζεται η ύπαρξη πολλών μικρότερων απροσδιόριστων και κάποιες φορές αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών κάτω από τις κορυφές που μας ενδιαφέρουν. Αυτός ο θόρυβος είναι πάντα παρών, άλλα σχεδόν μη ανιχνεύσιμος σε καλής ποιότητας δείγματα που δίνουν καλής ισχύος σήματος. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η μέθοδος του καθαρισμού (purification) των προϊόντων της PCR.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση στηλών διοξειδίου του πυριτίου που είναι θετικά φορτισμένες στις κατάλληλες συνθήκες με αποτέλεσμα να δεσμεύουν τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα. Τα υπόλοιπα συστατικά απομακρύνονται με ειδικό πλυστικό και τελικά παραλαμβάνεται μόνο το DNA. Τα προϊόντα όλων των PCR υφίσταντο καθαρισμό με το εμπορικό κιτ PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ο οποίος παρείχε όλα τα αντιδραστήρια, τις στήλες και τα σωληνάρια συλλογής.

Πειραματική διαδικασία

Πρώτο στάδιο ήταν η ανασύσταση δυο διαλυμάτων. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 15 ml ισοπροπανόλης 100% στα 10ml του διαλύματος πρόσδεσης, Binding Buffer (B2) και

32 ml αιθανόλης 96-100% στα 8 ml διαλύματος έκπλυσης, Wash Buffer (W1), τα οποία αναδεύτηκαν ήπια ώστε να γίνουν ομοιογενή. Το σωληνάριο τύπου erpendorf της PCR (0.2ml) περιείχε 45μL προϊόντος της PCR, αφού 5μL χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση. Στα 45μL προϊόντος της PCR έγινε προσθήκη Binding Buffer (B2) σε αναλογία 1:4 (δηλαδή 180μL), καλή ανάμειξη και μεταφορά του μείγματος στη στήλη καθαρισμού, PureLink Spin Column η οποία ήταν τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (Certifigure 5424, Eppendorf, Germany) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στις 11.000 rpm και το διηθημένο διάλυμα απορρίφθηκε. Εν συνεχεία, στη στήλη έγινε μεταφορά 650 μl Wash Buffer (W1), φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στις 11.000 rpm και απόρριψη του διηθήματος. Η στήλη φυγοκεντρήθηκε ξανά σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (14.600 rpm) για την απομάκρυνση της περίσσειας ποσότητας του ανασυσταμένου διαλύματος Wash Buffer (W1), διότι η αιθανόλη αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της αλληλούχησης κατά Sanger. Έπειτα, το σωληνάριο συλλογής απορρίφθηκε, η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο έκλουσης Elution Tube και προστέθηκαν 50 μl του διαλύματος έκλουσης, Elution Buffer (E1, 10mM Tris-HCl, pH 8,5) στο κέντρο κάθε στήλης. Ακολούθησε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στις 14.600 rpm και απόρριψη της στήλης. Το διηθημένο διάλυμα (~50 μl) περιείχε καθαρό DNA (προϊόν της PCR) και αποθηκεύτηκε στους -20°C πριν την αλληλούχηση. Απαραίτητο τελικό στάδιο ήταν η ηλεκτροφόρηση (ενότητα 2.7.8) για την επιβεβαίωση ύπαρξης προϊόντος μετά τον καθαρισμό αυτού.

2.7.10. Αλληλούχηση DNA (DNA sequencing)

Αρχή μεθόδου

Η αλληλούχηση του DNA είναι η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του εκάστοτε υπό μελέτη τμήματος του γονιδιώματος. Στην παρούσα μελέτη, η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger (Sanger *et al.*, 1977) ή αλλιώς μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας (Chain termination method-Sanger sequencing). Πρόκειται για

μια *in vitro* ενζυμική μέθοδος προσδιορισμού της ακολουθίας των νουκλεοτιδικών βάσεων που απαρτίζουν ένα τμήμα DNA το οποίο είναι είτε κλωνοποιημένο είτε προϊόν PCR. Χαρακτηρίζεται ενζυμική, διότι χρησιμοποιεί τη DNA πολυμεράση για την ανάλυση της αλληλουχίας (Sanger *et al.*, 1977). Η βασική αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στη χρήση σημασμένων τριφωσφορικών 2',3'- διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) ως μόρια τερματισμού της DNA αλληλουχίας (Hood *et al.*, 1987).

Η αντίδραση είναι παρόμοια με την PCR. Η βασική διαφορά είναι ότι χρησιμοποιείται ένας εκκινητής, με αποτέλεσμα η ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου να γίνεται γραμμικά. Συγκεκριμένα, για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται ένα μονόκλωνο DNA, ένας μόνο DNA-εκκινητής, μια DNA-πολυμεράση, φυσιολογικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTP) και τριφωσφορικά 2',3'- διδεοξυνουκλεοτίδια, τα οποία τερματίζουν την επιμήκυνση του DNA-κλώνου. Οι τριφωσφορικές διδεοξυριβονουκλεοτιδικές βάσεις (ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) είναι σημασμένες με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χημικές ομάδες (Hood *et al.*, 1987), οι οποίες εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος και στερούνται την 3'-OH ομάδα. Κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης του εκκινητή από την DNA πολυμεράση, μπορεί στον νέο κλώνο DNA να προστεθούν τυχαία ddNTPs αντί για dNTPs. Αυτά τα σημασμένα ddNTP ενσωματώνονται φυσιολογικά κατά την αντιγραφή σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA μέσω των 5'τριφωσφορικών ομάδων τους, αλλά δεν μπορούν να ενωθούν με το επόμενο τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP) που θα έρθει να προστεθεί στην αλυσίδα, επειδή δεν διαθέτουν την ελεύθερη στο 3'άκρο υδροξυλοομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού. Με τη χρήση διαφορετικής φθορίζουσας χρωστικής για κάθε ddNTP, τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται διακρίνονται μεταξύ τους. Κατά την αντιγραφή του μονόκλωνου DNA τα ddNTP ενσωματώνονται σε τυχαία θέση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν τμήματα DNA ποικίλου μήκους και με οποιαδήποτε από τις τέσσερις φθορίζουσες βάσεις στο 3'άκρο τους. Αυτές οι τέσσερις αντιδράσεις τερματισμού πραγματοποιούνται σε μία μόνο αντίδραση, η ανάλυση γίνεται σε μία μόνο στήλη και σε μια διαδρομή του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης(Watson *et al.*, 2007).

Όλα τα τμημάτων DNA ποικίλου μήκους ηλεκτροφορούνται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μια διαδρομή και διαχωρίζονται βάση μεγέθους. Με αυτό τον τρόπο τα τμήματα τοποθετούνται σε σειρά αυξανόμενου μεγέθους όπου το κάθε τμήμα διαφέρει από το προηγούμενο κατά ένα νουκλεοτίδιο. Η ύπαρξη των φθορίζουσων χρωστικών γνωστοποιεί το τελευταίο νουκλεοτίδιο κάθε τμήματος. Αυτά τα φθοροσημασμένα τμήματα εντοπίζονται αυτόματα σε πραγματικό χρόνο κατά την ηλεκτροφόρηση καθώς διέρχονται διαδοχικά από το σύστημα ανίχνευσης του μηχανήματος αλληλούχησης με λέιζερ. Η χρωστική που είναι συνδεδεμένη σε κάθε ddNTP, στο άκρο κάθε τμήματος διεγείρεται από την ακτίνα λέιζερ ενός ανιχνευτή, ο αισθητήρας του οποίου καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός, εκπέμποντας ένα χαρακτηριστικό σήμα. Το σήμα αυτό αντιστοιχεί σε μια από τις τέσσερις βάσεις και η ανίχνευση του αποκαλύπτει την ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση της αλυσίδας. Η ανάλυση του σήματος γίνεται στον υπολογιστή, που είναι συνδεδεμένος με τη συσκευή αλληλούχησης (DNA sequencer), και λαμβάνεται το ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram). Το τελευταίο απεικονίζει διαδοχικές κορυφές ανάλογες με το χρώμα φθορισμού και την αντίστοιχη βάση τους. Η σειρά των βάσεων αντιστοιχεί στην αλληλουχία του προς μελέτη γονιδίου (Watson *et al.*, 2007).

Πειραματική διαδικασία

Στο DNA, που προέκυψε από τη διαδικασία του καθαρισμού των προϊόντων της PCR, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση. Στο "καθαρό" DNA πραγματοποιήθηκαν δυο αντιδράσεις αλληλούχησης, μια με τον εμπρόσθιο εκκινητή και μια με τον οπίσθιο εκκινητή για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η διαδικασία της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της εταιρείας παροχής υπηρεσιών αλληλούχησης (CEMIA, Larissa, Greece), όπου στάλθηκαν το καθαρό DNA, 5 pmol/μL του εμπρόσθιου εκκινητή και 5 pmol/μL του οπίσθιου εκκινητή του υπό μελέτη γονιδίου. Η διαδικασία αλληλούχησης έγινε σε αυτόματο DNA sequencer (ABI 3730 Genetic Analyzer). Τα αποτελέσματα-ηλεκτροφεογράμματα από την στάλθηκαν εταιρείας παροχής υπηρεσιών αλληλούχησης και επεξεργάστηκαν με το λογισμικό MEGA 6.

2.8. Τυποποίηση των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii*

2.8.1. Τυποποίηση των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* με τη μέθοδο

Multispacer Sequencing Typing (MST)

Ο πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας DNA αποτέλεσε μέθοδο μοριακής τυποποίησης των κλώνων των υπό μελέτη μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης. Πρόκειται για ένα τυποποιημένο σχήμα που βασίζεται στην ανάλυση οχτώ μεταβλητών διαγονιδιακών διαχωριστικών αλληλουχιών (variable intergenic spacers) του μυκοβακτηριακού χρωμοσώματος. Το μήκος των περιοχών που ενισχύονται σε αυτό το σχήμα είναι κυρίως 400-600bp βάσει της αλληλουχία αναφοράς του *M. tuberculosis* H37Rv. Ωστόσο, το μήκος αυτό μπορεί να είναι μεγαλύτερο εξαιτίας του μεταβλητού αριθμού και μεταβλητού μεγέθους των αλληλοδιαδοχικών επαναλήψεις μεταξύ των διαφόρων στελεχών. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ενίσχυση με PCR των οχτώ διαγονιδιακών περιοχών και την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέσω της οποίας κάθε διαχωριστικό αλληλίλο (spacer allele) αποκτά έναν αριθμό. Κάθε στέλεχος χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό αυτών των αλληλίων (allelic profile) των οχτώ διαγονιδιακών διαχωριστικών περιοχών. Κάθε μοναδικό αλληλόμορφο προφίλ αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό τύπο αλληλουχιών που καταχωρείται ως προφίλ ST (Spacer Type profile) του στελέχους, το οποίο χαρακτηρίζει το στέλεχος ή ένα κλώνο μυκοβακτηριδίου. Στελέχη με τον ίδιο ST αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου. Πληροφορίες για τα προφίλ ST των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης, καθώς και επιδημιολογικά δεδομένα βρίσκονται καταχωρημένα στον επίσημο ιστοτόπο της MST http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/mycobacterium_tuberculosis/ που παρέχονται από το Méditerranée Infection Foundation. Για την τυποποίηση των μυκοβακτηριακών στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* χρησιμοποιήθηκε το διαθέσιμο σχήμα MST (Djelouadji *et al*, 2008). Το σχήμα αυτό δεν χρησιμοποιείται για την τυποποίηση στελεχών *M. bovis*. Σημαντικό ρόλο στην διεξαγωγή της μεθόδου παίζει η ελεύθερη πρόσβαση στην ενημερωμένη βάση δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Αυτές αποτελούν τη βάση μιας κοινής γλώσσας για τη μοριακή τυποποίηση των στελεχών σε διεθνές επίπεδο.

Πειραματική Διαδικασία

Για την τυποποίηση των στελεχών 48 *M. tuberculosis*/*M. cannetii* βάσει της μεθόδου MST ενισχύθηκαν οχτώ μεταβλητές διαγονιδιακές διαχωριστικές περιοχές, των οποίων οι αλληλουχίες εκκινητών φαίνονται στον Πίνακα 2.13.

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητή	Μέγεθος PCR προϊόντων
MST1	MST1A-R	5'-GATGGTCTCCCGGCTGAT-3'	308 bp
	MST1A-F	5'-GCTGGCCGATCTGCGCGC-3'	
MST2	MST2A-R	5'-GCGCCAAGGCCACCGGCCAA-3'	338 bp
	MST2A-F	5'-GCCCCGCCAGCGGTGAACTGG-3'	
MST3	MST3A-R	5'-CTGTGGCAGGCTCCCGGTAG-3'	275 bp
	MST3A-F	5'-TCGAGGATTCTGGGACTAT-3'	
MST4	MST4A-R	5'-GATCAGCTACGGGTGGCCG-3'	308 bp
	MST4A-F	5'-ATGGGTTCGCCAGACGGCGAG-3'	
MST8	MST8 A-F	5'-GCCGCAATCACAAACGACAT-3'	455 bp
	MST8 A-R	5'-GCTACTTCGACGACGTGTAT-3'	
MST11	MST11A-F	5'-AGGTGTTAGAGGTGGTGGAT-3'	692 bp
	MST11A-R	5'-AACCAAAGTCATATTGGGATGAG-3'	
MST12	MST12A-F	5'-GTTGATCGAGGCCATCACG-3'	637 bp
	MST12A-R	5'-GAATAGGGCTTGGTACGTA-3'	
MST13	MST13A-F	5'-CGAGTTCACCGTCCATCATC-3'	554 bp
	MST13A-R	5'-GAGACACGGTCATCGACTT-3'	

Πίνακας 2.13: Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων των οχτώ μεταβλητών διαγονιδιακών διαχωριστικών περιοχών

Η προετοιμασία του μείγματος της αντίδρασης περιγράφηκε στην ενότητα 2.6. Ο τελικός όγκος αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν 50 μ L, ο οποίος αποτελείτο από 45 μ L μείγματος αντίδρασης και 5 μ L δείγμα. Οι συνθήκες κυκλοποίησης της αντίδρασης PCR ήταν αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 15 min, εν συνεχεία 35 κύκλους όπου περιλάμβαναν αποδιάταξη στους 94°C για 1 min, υβριδισμό στους 64°C για 1 min, επιμήκυνση στους 72°C για 1 min, και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR πηκτή αγαρόζης 2% για 30 λεπτά (ενότητα 2.14), καθαρισμός των προϊόντων της PCR (ενότητα 2.15) και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (ενότητα 2.16). Οι διαφορετικές αλληλουχίες για καθένα από τα οχτώ γονίδια προσδιορίστηκαν ως ξεχωριστά αλληλία και σημάνθηκαν με έναν αριθμό.

Ο αριθμός αυτός προέκυψε από τη σύγκριση αυτών με τις βάσεις δεδομένων MST. Ο συνδυασμός αυτών των οχτώ αριθμών, γνωστός ως προφίλ αλληλίου (allelic profile), αντιστοιχούσε σε έναν αριθμό χαρακτηριστικό για κάθε στέλεχος, τον προφίλ ST. Τα νέα προφίλ αλληλίων που προέκυψαν κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων των MST.

2.8.2. Τυποποίηση των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* με τη μέθοδο MIRU-

VNTR

Γενικά

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

Μια VNTR μέθοδος είναι η MIRUs. Τα Μυκοβακτηριακά Διάσπαρτα Επαναλαμβανόμενα Στοιχεία (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit) είναι διάσπαρτα μεταξύ 41 περιοχών στο γονιδίωμα του *M.tuberculosis* H37Rv και περιέχουν 51-77 bp επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Είκοσι τέσσερις ανεξάρτητες περιοχές από τις 41 έχουν δείξει πολυμορφισμό και χρησιμοποιούνται για ταυτοποίηση *M. tuberculosis* Complex (Le Flèche P *et al*, 2002). Αυτές οι περιοχές διαφέρουν ως προς τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων και στο μήκος (Weniger *et al*, 2010). Η μέθοδος αυτή ταυτοποίησης έχει δείξει σταθερότητα, επαναληψιμότητα και υψηλή διακρατική ικανότητα (O'Reilly *et al*, 1995).

Βασίζεται στην ενίσχυση με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές των 24 περιοχών. Η μεταβλητότητα των διαδοχικών επαναλήψεων από στέλεχος σε στέλεχος χρησιμεύει ως εργαλείο για τη διαφοροποίηση μεταξύ των MTBC. Ο αριθμός των επαναλήψεων (αλληλόμορφο) υπολογίζεται έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε μέγεθος (bp) και τα

αριθμητικά αποτελέσματα δηλώνονται σε μια online βάση δεδομένων για σύγκριση και ταυτοποίηση (Allix-Béguec *et al.*, 2008, Weniger *et al.*, 2010). Το μήκος των τμημάτων DNA που παράγονται μετά από ηλεκτροφόρηση σε αгарόζης πηκτή εξαρτάται από τον αριθμό των επαναλήψεων του. Η τυποποίηση MIRU-VNTR έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανίχνευση συνεχόμενων αλυσίδων μετάδοσης της φυματίωσης, τη διαφοροποίηση της υποτροπής από περιπτώσεις επανεμφάνισης και την ανίχνευση της εργαστηριακής μόλυνσης.

Παρά τη χρησιμότητά της στις μελέτες μετάδοσης της φυματίωσης, είναι επίπονη και χρονοβόρα λόγω του υψηλού αριθμού των επιμέρους PCR που απαιτούνται (Comas *et al.*, 2009). Για να επιτευχθεί η υψηλότερη διακριτική ισχύς και να καταστεί η μέθοδος πιο αποτελεσματική σε περιοχές με περιορισμένες γενεές, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά ελάχιστα σύνολα τόπων που έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν μέγιστη διακριτική ισχύ και να ελαχιστοποιούν το κόστος γονοτυπίας για τις γεωγραφικά περιορισμένες γραμμές MTBC (Murase *et al.*, 2008, Shamputa *et al.*, 2010, Dong *et al.*, 2012).

Πειραματική διαδικασία

Η μέθοδος MIRU-VNTR εφαρμόστηκε στα 48 στελέχη *M. tuberculosis*/ *M. cannetii*. Για την εκτέλεση της ενισχύθηκαν 24 περιοχές, των οποίων οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 2.14.

Περιοχή (Loci)	Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών
MIRU04	<i>MIRU04F</i> <i>MIRU04R</i>	5'- GCGCGAGAGCCCGAACTG C -3' 5'- GCGCAGCAGAAACGC CAG C-3'
MIRU26	<i>MIRU26F</i> <i>MIRU26R</i>	5'- TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC-3' 5'- CATAGGCGACCAGGCGAATAG -3'
MIRU40	<i>MIRU40F</i> <i>MIRU40R</i>	5'- GGGTTGCTGGATGACAACGTGT -3' 5'-GGGTGATCTCGGCCGAAATCAGATA-3'
MIRU10	<i>MIRU10F</i> <i>MIRU10R</i>	5'- GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC-3' 5'- GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT -3'
MIRU16	<i>MIRU16F</i> <i>MIRU16R</i>	5'- TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA-3' 5'- CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC -3'
MIRU31	<i>MIRU31F</i> <i>MIRU31R</i>	5'- ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA-3' 5'- GTGCCGACGTGGTCTTGAT -3'
VNTR42	<i>Mtub04_VNTR42F</i> <i>Mtub04_VNTR42R</i>	5'- CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT-3' 5'- GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC -3'
VNTR43	<i>ETRC_VNTR43F</i> <i>ETRC_VNTR43R</i>	5'- CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT -3' 5'- AATGACTTGAACGCGCAAATGTGA-3'
ETRA	<i>ETRAF</i> <i>ETRAR</i>	5'- AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT-3' 5'- CGAAGCCTGGGGTGCCCCGCGATTT-3'
VNTR47	<i>Mtub30_VNTR47F</i> <i>Mtub30_VNTR47R</i>	5'- CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT -3' 5'- ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA-3'
VNTR52	<i>Mtub39_VNTR52F</i> <i>Mtub39_VNTR52R</i>	5'- CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC -3' 5'- TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG-3'
VNTR53	<i>QUB4156c_VNTR53F</i> <i>QUB4156c_VNTR53R</i>	5'- TGACCACGGATTGCTCTAGT-3' 5'- GCCGGCGTCCATGTT -3'
QUB-11b	<i>QUB 2163b_QUB-11bF</i> <i>QUB 2163b_QUB-11bR</i>	5'- CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG-3' 5'- CGAAGTGAATGGTGGCAT -3'
1955	<i>Mtub21_1955F</i> <i>Mtub21_1955R</i>	5'- AGATCCCAGTTGTCGTGTC -3' 5'- CAACATCGCCTGGTCTGTGA-3'
QUB-26	<i>QUB-26F</i> <i>QUB-26R</i>	5'- AACGCTCAGCTGTCCGGAT -3' 5'- CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCAGAT-3'
MIRU02	<i>MIRU02F</i> <i>MIRU02R</i>	5'- TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT-3' 5'- TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT -3'
MIRU 23	<i>MIRU 23F</i> <i>MIRU 23R</i>	5'- CTGTGATGGCCGCAACAAAACG -3' 5'- AGCTCAACGGGTTGCGCCCTTTTGTC-3'
MIRU 39	<i>MIRU 39F</i> <i>MIRU 39R</i>	5'- CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC-3' 5'- CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT -3'
MIRU20	<i>MIRU20F</i> <i>MIRU20R</i>	5'- TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG -3' 5'- GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA-3'
MIRU24	<i>MIRU24F</i> <i>MIRU24 R</i>	5'- CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT-3' 5'- GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA -3'
MIRU27	<i>MIRU27F</i> <i>MIRU27R</i>	5'- TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA-3' 5'- GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA -3'
VNTR46	<i>Mtub29_VNTR46F</i> <i>Mtub29_VNTR46R</i>	5'- GCCAGCCGCGTGCATAAACCT -3' 5'- AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC-3'
VNTR48	<i>ETRB_VNTR48F</i> <i>ETRB_VNTR48R</i>	5'- ATGGCCACCCGATACCGCTTCACT -3' 5'- CGACGGGCCATCTTGATCAGCTAC-3'
VNTR49	<i>Mtub34_VNTR49F</i> <i>Mtub34_VNTR49R</i>	5'- GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA -3' 5'- GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC-3'

Πίνακας 2.14 Εκκινητές για την εφαρμογή της μεθόδου MIRU-VNTR

Αρχικά, παρασκευάστηκε σε ξεχωριστό σωληνάριο τύπου erpendorf των 2ml το μείγμα της αντίδρασης για κάθε περιοχή που ενισχύθηκε, σε ποσότητα πολλαπλάσια του ρυθμού των δειγμάτων συν τους δυο μάρτυρες (αρνητικό, θετικό). Στον Πίνακα 2.15 παρουσιάζεται η σύνθεση του μείγματος για ένα δείγμα, για το εκάστοτε γονίδιο που ενισχύθηκε:

Περιοχή (Loci)	MIRU04, MIRU26, MIRU40, VNTR47, VNTR52, VNTR53	MIRU10, MIRU16, MIRU31, VNTR46, VNTR48, VNTR49	MIRU20, MIRU24, MIRU27, VNTR42, VNTR43, ETRA, QUB11b, 1955, QUB26	MIRU2, MIRU23, MIRU39
10x taq Buffer με KCl	2 μl	2 μl	2 μl	2 μl
MgCL ₂ (25mM)	1.2 μl /3mM	0.4 μl /2mM	0 μl /1.5mM	0.8 μl /2.5mM
Μείγμα dNTPs(5mM)	0.8 μl	0.8 μl	0.8 μl	0.8 μl
Primer Forward (25pmol/μL)	0.4 μl	0.4 μl	0.4 μl	0.4 μl
Primer Reverse (25pmol/μL)	0.4 μl	0.4 μl	0.4 μl	0.4 μl
Hotstart DNA πολυμεράση (Qiagen)	0.08 μl	0.08 μl	0.08 μl	0.08 μl
dH ₂ O	9.1 μl	9.9 μl	10.3 μl	9.5 μl
Τελικός όγκος	45 μl	45 μl	45 μl	45 μl

Πίνακα 2.15 Η ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου για το μείγμα της αντίδρασης καθενός εκκινητή για ένα δείγμα

Ο τελικός όγκος αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν 50 μL, ο οποίος αποτελείτο από 45μL μείγματος αντίδρασης και 5μL δείγμα. Τα στάδια της PCR στον θερμοκυκλοποιητή (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific) ήταν ίδια για όλα τα γονίδια, τα εξής: αρχικά 1 κύκλος στους 95°C για 15 min, ακολουθούσαν 40 κύκλοι όπου γινόταν αποδιάταξη στους 94°C για 1 min, υβριδισμό στους 59°C για 1 min, επιμήκυνση στους 72°C για 1:30 min, και τελικό στάδιο 1 κύκλος στους 72°C για 10 min. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 3% (Nu-Sieve) και σε σταθερή τάση 120V για 5 ώρες. Για τον προσδιορισμό του μήκους των τμημάτων χρησιμοποιήθηκαν δυο μάρτυρες, ένας 100bp και ένας 50 bp.

Σύμφωνα με το μήκος των προϊόντων PCR προσδιορίστηκε ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών για κάθε MIRU και σημάνθηκε με κάποιο αριθμό, από

το 1 έως το 15. Ο αριθμός αυτός προέκυψε από τη σύγκριση αυτών με τις βάσεις δεδομένων MIRU-VNTR. Κάθε στέλεχος χαρακτηρίστηκε από το συνδυασμό των 24 γενετικών τόπων, που αποτελούν το γενετικό αποτύπωμα του στελέχους. Με την καταχώρηση αυτού του συνδυασμού στη μια βάση δεδομένων του επίσημου ιστοτόπου της MIRU-VNTR <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>, κατατάσσονταν το στέλεχος σε κάποια γνωστή οικογένεια-γονότυπο (π.χ. Beijing, Harleem κτλ) ή όχι, αν παρουσίαζε μοναδικό τύπο.

2.8.3. Τυποποίηση στελεχών Beijing με τη μέθοδο RFLP-PCR

Για την επιβεβαίωση της τυποποίησης των στελεχών Beijing χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP-PCR, ως μια απλή και γρήγορη μέθοδος.

Αρχή της μεθόδου

Η ανάλυση πολυμορφισμών μεγέθους τμημάτων περιορισμού μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης Πολυμορφισμού Μήκους Τμημάτων Περιορισμού-PCR (RFLP, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) είναι μια παραλλαγή της απλής PCR. Στη δεκαετία του 1990, η μέθοδος αυτή κατέστη η πρότυπη μέθοδος για αναζήτηση μεταλλάξεων και για τυποποίηση στελεχών με μοριακές μεθόδους. Βασίζεται στη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού. Πρόκειται για ένζυμα που αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων με οκτώ νουκλεοτιδίων και τέμνουν το DNA σε ποικίλες αποστάσεις από αυτά τα σημεία ακόμα κι εντός αυτών.

Συγκεκριμένα έγινε ενίσχυση και πέψη του γονιδίου *Rv1258c*. Το γονίδιο *Rv1258c* κωδικοποιεί την αντλία εκροής Tap των *M. tuberculosis*, όπου μεταφέρονται διάφορα αντιφυματικά όπως η στρεπτομυκίνη. Για αυτό, μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό θεωρήθηκαν ότι σχετίζονται πιθανώς με αντοχή στην στρεπτομυκίνη (Aínsa *et al.*, 1998, De Rossi *et al.*, 2002, Ramón-García *et al.*, 2012). Αντί αυτού δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση με αντοχή, άλλα βρέθηκε μια εισαγωγή ενός νουκλεοτιδίου σε όλα τα στελέχη της οικογένειας Beijing. Πρόκειται για την εισαγωγή της κυτοσίνης μεταξύ των θέσεων 580 και 581 της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου και η οποία ονομάστηκε Tap⁵⁸⁰. Σύμφωνα με τους Villellas *et al.* (2013), όταν το ενισχυμένο γονίδιο *Rv1258c* κοπεί με το

ένζυμο περιορισμού XhoI τα Beijing στελέχη εξαιτίας της εισαγωγής της κυτοσίνης δεν πέπτονται ενώ τα μη Beijing στελέχη πέπτονται. Το ένζυμο περιορισμού XhoI, προέρχεται από το μικροοργανισμό *Xanthomonas holcicola*, αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία 5'-CTCGAG-3' μετά την πρώτη κυτοσίνη με κατεύθυνση 5' προς 3'. Στην Εικόνα 2.4 παρουσιάζονται οι θέσεις κοπής του ενζύμου:



Εικόνα 2.4: Σημεία κοπής το ενζύμου περιορισμού XhoI

Πειραματική διαδικασία

Το πρωτόκολλο του μείγματος αντίδρασης της PCR αναφέρεται στην ενότητα 2.5.2. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση μιας περιοχής του γονιδίου *Rv1258c* μήκους 1052bp είναι οι *Rv1258c_ctap9F*: 5'-GTT GTT CGC CAC GCT GGT CG-3' και *Rv1258c_ctap10R*: 5'- CCA GAT CCA GTT CGC GCA G-3'. Οι συνθήκες ενίσχυσης του γονιδίου στον θερμοκυκλοποιητή (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific) ήταν οι εξής: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 9 min, στη συνέχεια 40 κύκλοι ου περιελάμβαναν αποδιάταξη στους 94°C για 1 min, υβριδισμό στους 65°C για 2 min, επιμήκυνση στους 72°C για 2 min, και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min. Στην συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού της συγκεκριμένης περιοχής. Ακολούθησε, η πέψη με το ένζυμο περιορισμού το XhoI (ThermoFisher Scientific). Τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες για την εκτέλεση της πέψης παρέχονται από τον κατασκευαστή του ενζύμου. Στον παρακάτω Πίνακα 2.16 περιγράφεται το πρωτόκολλο της αντίδρασης της πέψης για κάθε δείγμα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
PCR προϊόν	6 μl
10xBuffer R	1.5
XhoI	0.75
dH ₂ O	6.75
Τελικός Όγκος	12 μl

Πίνακας 2.16: Η ποσότητα του κάθε αντιδραστηρίου για την πέψη με το ένζυμο περιορισμού το XhoI ενός δείγματος

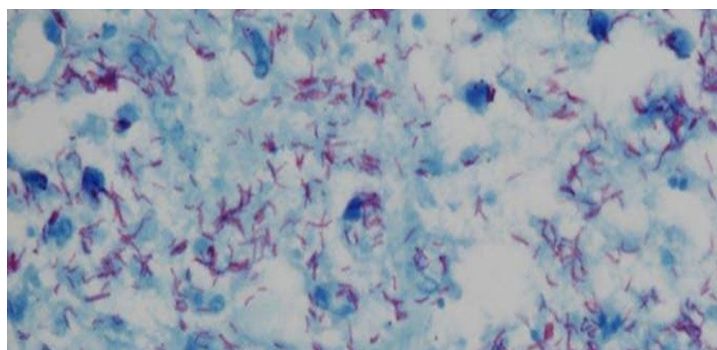
Το μείγμα της αντίδρασης πέψης περιέχονταν σε σωληνάρια τύπου erppendorf των 0,2ml, τα οποία αναδεύτηκαν ελαφρά σε συσκευή vortex (BE 101V, BICASA) και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο (LAUDA M20, SpectraLab) στους 37°C για 16 ώρες. Στην συνέχεια, ηλεκτροφορήθηκαν (ενότητα 2.7.8) τα 12 μ L των προϊόντων της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 1% για 1 ώρα, ώστε να οπτικοποιηθούν τα αποτελέσματα. Στα Beijing στελέχη το προϊόν της πέψης εμφανίστηκε στις 1052bp, ενώ στα μη-Beijing στελέχη παρουσιάστηκαν δυο τμήματα των 413bp και 639bp.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ταυτοποίηση στελεχών *M. tuberculosis* Complex σε επίπεδο γένους και είδους

Στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του ΠΓΝΑ απομονώθηκαν 265 στελέχη *M. tuberculosis* Complex κατά το χρονικό διάστημα 2009-2017 από ένα σύνολο 10.000 κλινικών δειγμάτων. Τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από ασθενείς με πνευμονική φυματίωση (πτύελα, βρογχικές, γαστρικό). Ωστόσο στην μελέτη, συμπεριλήφθηκαν και δείγματα ασθενών με εξωπνευμονική φυματίωση απομονωθέντα από βιολογικά υλικά όπως ιστοί, λεμφαδένες και πλευριτικό υγρό. Οι ασθενείς νοσηλεύθηκαν κυρίως στην Πνευμονολογική Κλινική, άλλα και στην Ουρολογική και στην Παθολογική.

Συγκεκριμένα, τα 265 στελέχη ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο γένους με συμβατικές και σε επίπεδο είδους με μοριακές μεθόδους. Τα αποτελέσματα των συμβατικών μεθόδων βασίστηκαν στη χαρακτηριστική εικόνα των κόκκινων ινιδίων ή των νηματοειδών σχηματισμών του *M. tuberculosis* στο μικροσκόπιο έπειτα από χρώση με Zeihl Neelsen (Εικόνα 3.1), στις ξηρές κίτρινες-κρεμώδεις σε σωρούς αποικίες στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Lowenstein-Jensen (LJ) (Εικόνα 3.2) και στα χαρακτηριστικά λευκά συσσωματώματα που αιωρούνται στο υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MGIT 960 (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.1: Χαρακτηριστική εικόνα στο μικροσκόπιο κόκκινων ινιδίων του *M. tuberculosis* έπειτα από χρώση Zeihl-Neelsen



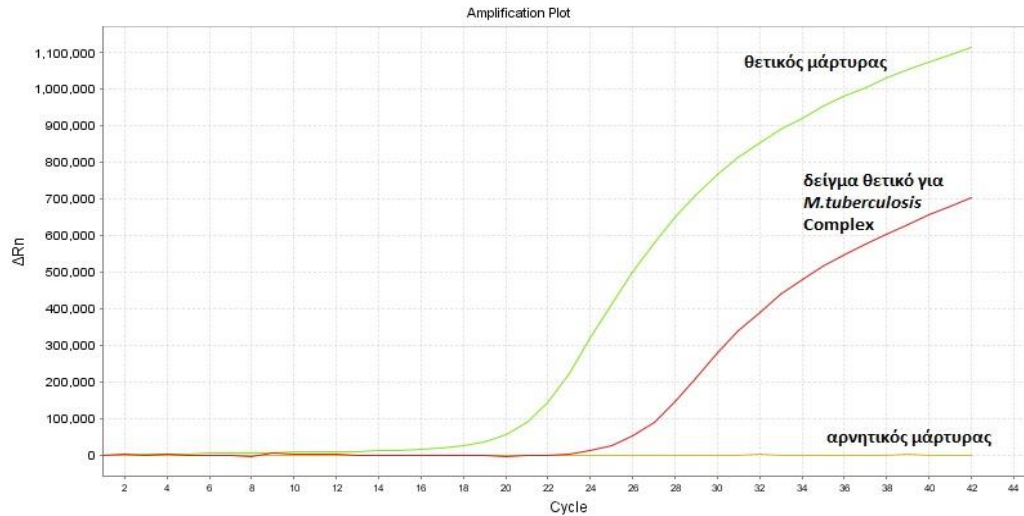
Εικόνα 3.2: Χαρακτηριστική εικόνα του *M. tuberculosis* στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Lowenstein-Jensen



Εικόνα 3.3: Χαρακτηριστική εικόνα του *M. tuberculosis* στο υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MGIT 960

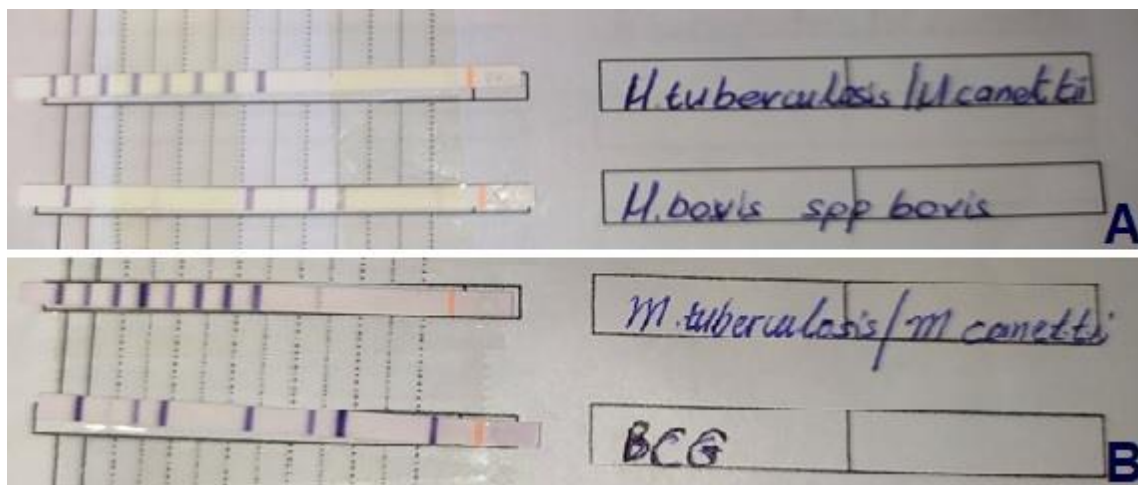
Στο στερεό θρεπτικό μέσο Lowenstein-Jensen αναπτύχθηκαν το 74.1% των στελεχών, ενώ στο υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας MGIT 960 αναπτύχθηκε το 96.3% των στελεχών. Επιπλέον, υπήρξε διαφορά στις μέρες επώασης μέχρι την ανάπτυξη των στελεχών *M. tuberculosis*: 1-40 μέρες στο MGIT 960 και 15-57 μέρες στο LJ. Η καλλιέργεια στο MGIT 960 έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και δίνει πιο γρήγορα αποτελέσματα.

Η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) έδειξε ότι και τα 265 στελέχη ήταν *M. tuberculosis* Complex. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη, όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4: Χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη (κόκκινη) θετικού δείγματος για *M. tuberculosis*

Με τη μέθοδο του ανάστροφου υβριδισμού, χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ GenoType MTBC Ver 1.X (Hain Lifescience), τα 265 στελέχη *M. tuberculosis* Complex διαχωρίστηκαν σε 259 στελέχη *M. tuberculosis/M. canettii*, 4 BCG και 2 *M. bovis* spp *bovis*. Παρακάτω (Εικόνα 3.5) απεικονίζονται τα αποτελέσματα στην ταινία υβριδοποίησης.



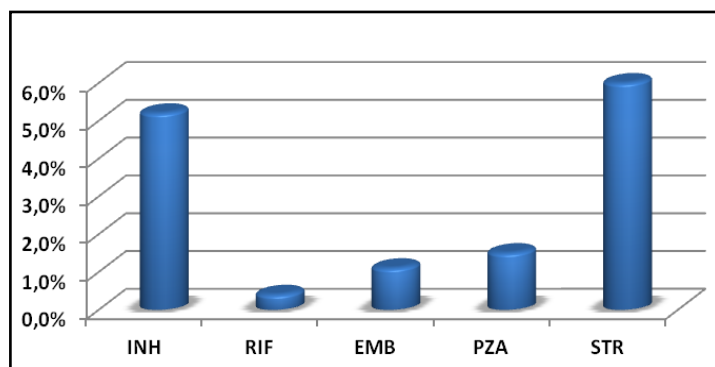
Εικόνα 3.5: Χαρακτηριστικές εικόνες ταινιών υβριδοποίησης των ειδών που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

3.2 Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιφυματικά 1ης και 2ης γραμμής στελεχών *M. tuberculosis* Complex

3.2.1 Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας στελεχών *M. tuberculosis* Complex

Σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI του 2011 (CLSI, M24-A, 2011) για τη μέθοδο ευαισθησίας σε υγρό θρεπτικό μέσο MGIT 960, από τα 265 απομονωθέντα στελέχη *M. tuberculosis* Complex 31 (11,69%) *M. tuberculosis*/*M. canettii* και 6 (2,26%) *M. bovis* ήταν ανθεκτικά, ενώ τα υπόλοιπα 228 ήταν ευαίσθητα στα πρώτης γραμμής (INH, RIF, EMB, PZA) και δεύτερης γραμμής (STR) αντιφυματικά φάρμακα. Σύμφωνα με το σκοπό της παρούσας μελέτης, επιλέχθηκαν για περαιτέρω χαρακτηρισμό όλα τα ανθεκτικά στελέχη (σύνολο 37) καθώς και 17 ευαίσθητα, τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία.

Στο σύνολο των 31 ανθεκτικών στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii*, 16 (6%) εμφάνισαν αντοχή στην στρεπτομυκίνη, 14 (5,2%) σε ισονιαζίδη, 4 (1,5%) σε πυραζιναμίδη, 3 (1,1%) σε αιθαμβουτόλη και 1 (0,4%) σε ριφαμπικίνη (Γράφημα 3.1). Από τα 31 ανθεκτικά στελέχη, τα 5 στελέχη ήταν ταυτόχρονα ανθεκτικά στην ισονιαζίδη και στη στρεπτομυκίνη και 2 στελέχη ταυτόχρονα ανθεκτικά σε πυραζιναμίδη και στρεπτομυκίνη. Μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη (n=4) και στην στρεπτομυκίνη (n=11). Στην μελέτη δεν βρέθηκαν στελέχη ούτε MDR-TB ούτε XDR-TB στελέχη. Τα 6 *M. bovis* στελέχη ήταν όλα ανθεκτικά μόνο στην πυραζιναμίδη, όπως άλλωστε αναμενόταν σύμφωνα με την εγγενή αντοχή του είδους. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα 54 κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν.



Γράφημα 3.1: Ποσοστά αντοχής των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii*

α/α	Κωδικός στελέχους	Χώρα Καταγωγής	Φύλο	Ηλικία	Κλινική	Βιολογικό υλικό	Ημερομηνία	Φαινότυπος	<i>M.tuberculosis</i> Complex
1	LAR221	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	79	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λαμίας	πτύελα	2009	INH-L	<i>M.canettii</i>
2	LAR232	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	53	Πνευμονολογική	πτύελα	2009	SM-H	<i>M.canettii</i>
3	LAR235	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	62	Πνευμονολογική	πτύελα	2009	RIF	<i>M.canettii</i>
4	LAR239	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	64	Πνευμονολογική	πτύελα	2010	SM-H	<i>M.canettii</i>
5	LAR240	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	74	ΜΕΘ	βρογχικές εκκρίσεις	2010	INH-L	<i>M.canettii</i>
6	LAR253	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	72	Πνευμονολογική	πτύελα	2010	INH-H, SM-L	<i>M.canettii</i>
7	LAR255	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	ΑΡΡΕΝ	25	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λαμίας	πτύελα	2010	INH-L	<i>M.canettii</i>
8	LAR258	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	82	Πνευμονολογική	βρογχικές εκκρίσεις	2010	SM-H	<i>M.canettii</i>
9	LAR265	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	ΑΡΡΕΝ	24	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λαμίας	πτύελα	2010	INH-L	<i>M.canettii</i>
10	LAR266	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	ΑΡΡΕΝ	26	Πνευμονολογική	πτύελα	2010	SM-L	<i>M.canettii</i>
11	LAR267	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	83	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λάρισας	πτύελα	2010	INH-L, SM-H	<i>M.canettii</i>
12	LAR268	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	50	Πνευμονολογική	πτύελα	2010	SM-H	<i>M.canettii</i>
13	LAR269	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	72	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λάρισας	πτύελα	2010	SM-L	<i>M.canettii</i>
14	LAR270	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	75	Πνευμονολογική	πτύελα	2010	SM-L	<i>M.canettii</i>
15	LAR277	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	44	Πνευμονολογική	πτύελα	2010	INH-H	<i>M.canettii</i>
16	LAR283	ΡΩΣΙΑ	ΘΗΛΥ	36	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λαμίας	γαστρικό υγρό	2011	INH-L, SM-H	<i>M.canettii</i>
17	LAR306	ΑΛΒΑΝΙΑ	ΑΡΡΕΝ	35	Πνευμονολογική	πτύελα	2011	INH-L	<i>M.canettii</i>
18	LAR325	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	82	Πνευμονολογική	πτύελα	2012	INH-H	<i>M.canettii</i>
19	LAR334	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	61	Παθολογική	πτύελα	2012	INH-L, SM-L	<i>M.canettii</i>
20	LAR337	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	53	Πνευμονολογική	πτύελα	2012	PZA	<i>M.canettii</i>
21	LAR354	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	ΑΡΡΕΝ	58	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λαμίας	πτύελα	2012	INH-L	<i>M.canettii</i>
22	LAR361	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	63	Πνευμονολογική	πτύελα	2013	INH-H	<i>M.canettii</i>
23	LAR364	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	Πνευμονολογική	ιστός	2013	EMB	<i>M.canettii</i>
24	LAR403	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	78	Πνευμονολογική	πτύελα	2014	EMB	<i>M.canettii</i>
25	LAR408	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	87	Πνευμονολογική	βρογχικές εκκρίσεις	2014	SM-H, PZA	<i>M.canettii</i>
26	LAR438	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	90	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λαμίας	πτύελα	2015	SM-H	<i>M.canettii</i>
27	LAR449	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	90	Παθολογική	γαστρικό υγρό	2016	SM-H	<i>M.canettii</i>
28	LAR454	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	87	Πνευμονολογική	πτύελα	2016	PZA	<i>M.canettii</i>
29	LAR458	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	Εξωτερικά Ιατρεία	βρογχικές εκκρίσεις	2016	INH-L, SM-H	<i>M.canettii</i>
30	LAR466	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	81	Πνευμονολογική	λεμφαδένας	2017	EMB	<i>M.canettii</i>
31	LAR474	ΑΛΒΑΝΙΑ	ΑΡΡΕΝ	53	Πνευμονολογική	πτύελα	2017	SM-H, PZA	<i>M.canettii</i>
32	LAR252	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	76	Ουρολογική	ούρα	2010	PZA	<i>M.bovis spp bovis</i>
33	LAR311	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	86	Ουρολογική	ούρα	2011	PZA	BCG
34	LAR340	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	45	Παθολογική	ούρα	2012	PZA	BCG
35	LAR350	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	77	Ουρολογική	ούρα	2012	PZA	BCG
36	LAR399	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	82	Παθολογική	ούρα	2014	PZA	BCG
37	LAR469	ΙΡΑΚ	ΑΡΡΕΝ	22	Παθολογική	λεμφαδένας	2017	PZA	<i>M.bovis spp bovis</i>
38	LAR211	ΑΛΒΑΝΙΑ	ΑΡΡΕΝ	31	Πνευμονολογική	πτύελα	2009	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
39	LAR227	ΓΕΩΡΓΙΑ	ΑΡΡΕΝ	41	Πνευμονολογική	πτύελα	2009	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
40	LAR241	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	58	Πνευμονολογική	πτύελα	2010	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
41	LAR248	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	Παθολογική	πύο	2010	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
42	LAR251	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	70	Πνευμονολογική	βρογχικές εκκρίσεις	2010	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
43	LAR254	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	Πνευμονολογική/ Γ.Ν.Λαμίας	γαστρικό υγρό	2010	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
44	LAR271	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	Πνευμονολογική	ούρα	2010	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
45	LAR282	ΑΛΒΑΝΙΑ	ΑΡΡΕΝ	38	Πνευμονολογική	πτύελα	2011	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
46	LAR326	ΕΛΛΑΔΑ	ΑΡΡΕΝ	90	Πνευμονολογική	πλευριτικό	2012	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
47	LAR348	ΟΥΚΡΑΝΙΑ	ΘΗΛΥ	54	Πνευμονολογική	πτύελα	2012	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
48	LAR371	ΠΑΛΑΙΣΤΙΝΗ	ΑΡΡΕΝ	21	Πνευμονολογική	πτύελα	2013	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
49	LAR372	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	ΘΗΛΥ	20	Πνευμονολογική	πτύελα	2013	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
50	LAR404	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	ΑΡΡΕΝ	32	Πνευμονολογική	γαστρικό υγρό	2014	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
51	LAR412	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	70	Πνευμονολογική	βρογχικές εκκρίσεις	2015	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
52	LAR442	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	ΑΡΡΕΝ	62	Πνευμονολογική	πτύελα	2016	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
53	LAR464	ΓΕΩΡΓΙΑ	ΑΡΡΕΝ	53	Πνευμονολογική	πτύελα	2017	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>
54	LAR465	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	34	Πνευμονολογική	FNA	2017	Ευαίσθησία	<i>M.canettii</i>

Πίνακας 3.1: Συνολικά τα υπό μελέτη κλινικά στελέχη *M. tuberculosis* Complex

3.2.2 Σύγκριση των τριών μεθόδων έλεγχου ευαισθησίας των 54 στελεχών

Τα αποτελέσματα έλεγχου ευαισθησίας της μεθόδου των μικροαραιώσεων σε υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H10 και του E-test ήταν συναφή με τα αποτελέσματα έλεγχου ευαισθησίας MGIT 960 και δεν υπήρξε κάποια απόκλιση μεταξύ των τριών μεθόδων. Τα δεκατέσσερα στελέχη με αντοχή στην ισονιαζίδη είχαν MIC ≥ 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων και MIC ≥ 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$) με τη μέθοδο E-test. Τα δεκαέξι στελέχη με αντοχή στην στρεπτομυκίνη είχαν MIC ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) και MIC ≥ 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ με το E-test (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Το ένα στέλεχος με αντοχή στη ριφαμπικίνη, που χαρακτηρίστηκε βάση της μεθόδου ευαισθησίας σε υγρό θρεπτικό μέσο MGIT 960, είχε την ίδια τιμή MIC: 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων και με τη μέθοδο E-test. Τα τρία στελέχη με αντοχή στην αιθαμβουτόλη είχαν την ίδια τιμή MIC: 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ με το E-test, ενώ με την μέθοδο των μικροαραιώσεων τα δύο στελέχη είχαν MIC: 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και το άλλο MIC: 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Τα τέσσερα στελέχη με αντοχή στην πυραζιναμίδη ελέγχθηκαν μόνο με τη μέθοδο ευαισθησίας σε υγρό θρεπτικό μέσο MGIT 960.

Όσον αφορά τα ευαίσθητα στελέχη σύμφωνα με τη μέθοδο ευαισθησίας σε υγρό θρεπτικό μέσο MGIT 960, όλα ήταν ευαίσθητα τόσο με τις ταινίες διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test) σε στερεό θρεπτικό υλικό όσο και με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε υγρό μέσο καλλιέργειας Middlebrook 7H10. Στα δεκαεπτά στελέχη που επιλέχθηκαν η μέση τιμή MIC ήταν στην ισονιαζίδη $\leq 0,096$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, στη ριφαμπικίνη $\leq 0,75$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, στην αιθαμβουτόλη ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και στη στρεπτομυκίνη $\leq 1,5$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ με τη μέθοδο E-test. Τα αντίστοιχα στελέχη με τη μέθοδο μικροαραιώσεων είχαν τιμές MIC στην ισονιαζίδη $\leq 0,12$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, στη ριφαμπικίνη ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, στην αιθαμβουτόλη ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και στη στρεπτομυκίνη ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Στον Πίνακα 3.2α που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ευαισθησίας και των τριών μεθόδων για τα ανθεκτικά στελέχη *M. tuberculosis/M. canettii*, στον Πίνακα 3.2β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ευαισθησίας για τα ευαίσθητα στελέχη *M. tuberculosis/M. canettii* και τέλος στον Πίνακα 3.2γ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ευαισθησίας για τα στελέχη *M. bovis*.

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ				ΑΝΤΟΧΗ	ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ (μg/ml)				ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ (μg/ml)				ΑΙΘΑΜΒΟΥΤΟΛΗ (μg/ml)			ΡΙΦΑΜΠΙΝΙΚΗ (μg/ml)			ΠΥΡΑΖΙΝΑΜΙΔΗ (μg/ml)
No TB	Χώρα καταγωγής	Φύλο	Ηλικία	Φαινότυπος	MGIT (0.1)	MGIT (0.4)	Sensititre	E-test	MGIT (1)	MGIT (4)	Sensititre	E-test	MGIT (5)	Sensititre	E-test	MGIT (1)	Sensititre	E-test	MGIT (100)
LAR221	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	79	INH-L	R	S	1	8	S	S	0.5	0.75	S	2	3	S	0.12	0.032	S
LAR240	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	74	INH-L	R	S	0.5	3	S	S	0.25	0.25	S	1	2	S	0.25	0.38	S
LAR255	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	APPEN	25	INH-L	R	S	0.5	4	S	S	1	0.75	S	1	1	S	0.25	0.5	S
LAR306	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	35	INH-L	R	S	0.5	4	S	S	0.25	0.25	S	1	1	S	0.12	0.125	S
LAR354	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	APPEN	58	INH-L	R	S	0.25	4	S	S	0.5	0.38	S	1	2	S	0.12	0.032	S
LAR265	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	APPEN	24	INH-L	R	S	0.5	8	S	S	0.5	0.38	S	2	3	S	0.5	0.25	S
LAR277	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	44	INH-H	R	R	2	32	S	S	0.25	0.5	S	0.5	1	S	0.12	0.016	S
LAR325	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	INH-H	R	R	2	32	S	S	1	1.5	S	2	1.5	S	0.12	0.19	S
LAR361	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	63	INH-H	R	R	4	64	S	S	0.25	0.5	S	2	2	S	0.12	0.25	S
LAR334	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	61	INH-L/SM-L	R	S	0.25	3	R	S	4	6	S	1	2	S	0.5	1	S
LAR253	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	72	INH-H/SM-L	R	R	4	48	R	S	2	6	S	2	3	S	0.25	0.38	S
LAR267	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	83	INH-L/SM-H	R	S	1	8	R	R	8	16	S	0.5	0.5	S	0.5	0.75	S
LAR283	ΡΩΣΙΑ	ΘΗΛΥ	36	INH-L/SM-H	R	S	0.5	4	R	R	8	8	S	2	1.5	S	0.5	1	S
LAR458	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	INH-L/SM-H	R	S	1	8	R	R	4	8	S	1	1.5	S	0.5	1	S
LAR266	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	APPEN	26	SM-L	S	S	0.12	0.096	R	S	4	8	S	0.5	0.5	S	0.12	0.094	S
LAR269	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	72	SM-L	S	S	0.06	0.048	R	S	8	12	S	2	1.5	S	0.12	0.064	S
LAR270	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	75	SM-L	S	S	0.03	0.032	R	S	4	6	S	1	1	S	0.12	0.016	S
LAR232	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	53	SM-H	S	S	0.03	0.016	R	R	32	48	S	0.5	0.5	S	0.12	0.047	S
LAR239	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	64	SM-H	S	S	0.06	0.048	R	R	>32	128	S	2	2	S	0.12	0.064	S
LAR258	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	SM-H	S	S	0.03	0.032	R	R	32	64	S	0.5	1	S	0.12	0.19	S
LAR268	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	50	SM-H	S	S	0.03	0.016	R	R	8	16	S	0.5	0.5	S	0.25	0.5	S
LAR438	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	SM-H	S	S	0.03	0.016	R	R	16	32	S	0.5	0.5	S	0.12	0.047	S
LAR449	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	SM-H	S	S	0.06	0.032	R	R	8	12	S	0.5	1	S	0.12	0.016	S
LAR408	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	87	SM-H/PZA	S	S	0.03	0.032	R	R	8	12	S	2	1	S	0.25	0.75	R
LAR474	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	53	SM-H/PZA	S	S	0.03	0.032	R	R	8	128	S	2	1.5	S	0.12	0.25	R
LAR364	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	EMB	S	S	0.12	0.064	S	S	1	0.75	R	8	8	S	0.12	0.032	S
LAR403	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	78	EMB	S	S	0.06	0.048	S	S	0.25	0.38	R	4	8	S	0.12	0.016	S
LAR466	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	81	EMB	S	S	0.03	0.016	S	S	0.5	0.38	R	4	8	S	0.5	0.5	S
LAR235	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	62	RIF	S	S	0.03	0.032	S	S	0.25	0.5	S	2	3	R	8	8	S
LAR337	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	53	PZA	S	S	0.03	0.016	S	S	0.5	0.5	S	1	2	S	0.12	0.016	R
LAR454	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	87	PZA	S	S	0.03	0.016	S	S	0.25	0.38	S	0.5	0.5	S	0.12	0.032	R

Πίνακας 3.2α: Συγκενρωτικά αποτελέσματα ευαισθησίας των τριών μεθόδων για τα στελέχη *M. tuberculosis* / *M. canettii*

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ				ΑΝΤΟΧΗ	ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ (μg/ml)			ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ (μg/ml)			ΑΙΘΑΜΒΟΥΤΟΛΗ (μg/ml)			ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ (μg/ml)			ΠΥΡΑΖΙΝΑΜΙΔΗ (μg/ml)
No TB	Χώρα προέλευσης	Φύλο	Ηλικία	Φαινότυπος	MGIT (0.1)	Sensititre	E-test	MGIT (1)	Sensititre	E-test	MGIT (5)	Sensititre	E-test	MGIT (1)	Sensititre	E-test	MGIT (100)
LAR211	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	31	Ευαίσθητο	S	0.03	0.032	S	0.5	0.75	S	1	1	S	1	0.75	S
LAR227	ΓΕΩΡΓΙΑ	APPEN	41	Ευαίσθητο	S	0.06	0.032	S	0.5	0.5	S	1	0.5	S	1	0.094	S
LAR241	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	58	Ευαίσθητο	S	0.03	0.016	S	1	0.75	S	2	1.5	S	0.12	0.016	S
LAR248	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	Ευαίσθητο	S	0.06	0.048	S	0.5	0.38	S	1	2	S	0.25	0.032	S
LAR251	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	70	Ευαίσθητο	S	0.12	0.064	S	0.25	0.38	S	1	1	S	0.5	0.047	S
LAR254	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	Ευαίσθητο	S	0.06	0.096	S	0.5	1	S	1	0.5	S	0.5	0.064	S
LAR271	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	Ευαίσθητο	S	0.03	0.032	S	1	1.5	S	1	1	S	1	0.19	S
LAR282	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	38	Ευαίσθητο	S	0.03	0.016	S	0.5	1	S	2	2	S	1	0.75	S
LAR326	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	Ευαίσθητο	S	0.12	0.096	S	0.25	0.5	S	1	2	S	0.12	0.032	S
LAR348	ΟΥΚΡΑΝΙΑ	ΘΗΛΥ	54	Ευαίσθητο	S	0.06	0.048	S	1	1.5	S	1	1	S	0.12	0.023	S
LAR371	ΠΑΛΑΙΣΤΙΝΗ	APPEN	21	Ευαίσθητο	S	0.03	0.016	S	1	0.75	S	2	1	S	0.12	0.016	S
LAR372	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	ΘΗΛΥ	20	Ευαίσθητο	S	0.03	0.032	S	0.5	0.75	S	2	1.5	S	0.12	0.012	S
LAR404	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	APPEN	32	Ευαίσθητο	S	0.06	0.048	S	1	2	S	0.5	0.5	S	1	0.75	S
LAR412	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	70	Ευαίσθητο	S	0.06	0.064	S	0.5	0.5	S	0.5	1	S	1	0.5	S
LAR442	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	APPEN	62	Ευαίσθητο	S	0.12	0.096	S	1	1.5	S	1	1.5	S	0.5	0.047	S
LAR464	ΓΕΩΡΓΙΑ	APPEN	53	Ευαίσθητο	S	0.03	0.016	S	1	0.75	S	2	2	S	0.12	0.032	S
LAR465	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	34	Ευαίσθητο	S	0.03	0.016	S	0.25	0.5	S	0.5	0.5	S	0.25	0.064	S

Πίνακας 3.2β: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ευαισθησίας των τριών μεθόδων για τα ευαίσθητα στελέχη *M. tuberculosis* / *M. canettii*

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ				ΑΝΤΟΧΗ	ΙΣΟΝΙΑΖΙΔΗ (μg/ml)			ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ (μg/ml)			ΑΙΘΑΜΒΟΥΤΟΛΗ (μg/ml)			ΡΙΦΑΜΠΙΚΙΝΗ (μg/ml)			ΠΥΡΑΖΙΝΑΜΙΔΗ (μg/ml)
No TB	Χώρα προέλευσης	Φύλο	Ηλικία	Φαινότυπος	MGIT (0.1)	Sensititre	E-test	MGIT (1)	Sensititre	E-test	MGIT (5)	Sensititre	E-test	MGIT (1)	Sensititre	E-test	MGIT (100)
LAR252	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	76	PZA	S	0.06	0.032	S	0.5	0.75	S	1	1	S	0.25	0.016	R
LAR311	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	86	PZA	S	0.03	0.048	S	0.5	0.25	S	1	0.5	S	0.12	0.016	R
LAR340	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	45	PZA	S	0.03	0.032	S	0.25	0.38	S	0.5	1	S	0.25	0.012	R
LAR350	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	77	PZA	S	0.03	0.032	S	0.5	0.38	S	0.5	1	S	0.12	0.032	R
LAR399	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	PZA	S	0.03	0.016	S	0.25	0.5	S	0.5	0.5	S	0.12	0.047	R
LAR469	ΙΡΑΚ	APPEN	22	PZA	S	0.12	0.096	S	1	1	S	0.5	0.5	S	1	0.094	R

Πίνακας 3.2γ: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ευαισθησίας των τριών μεθόδων για τα στελέχη *M. bovis*

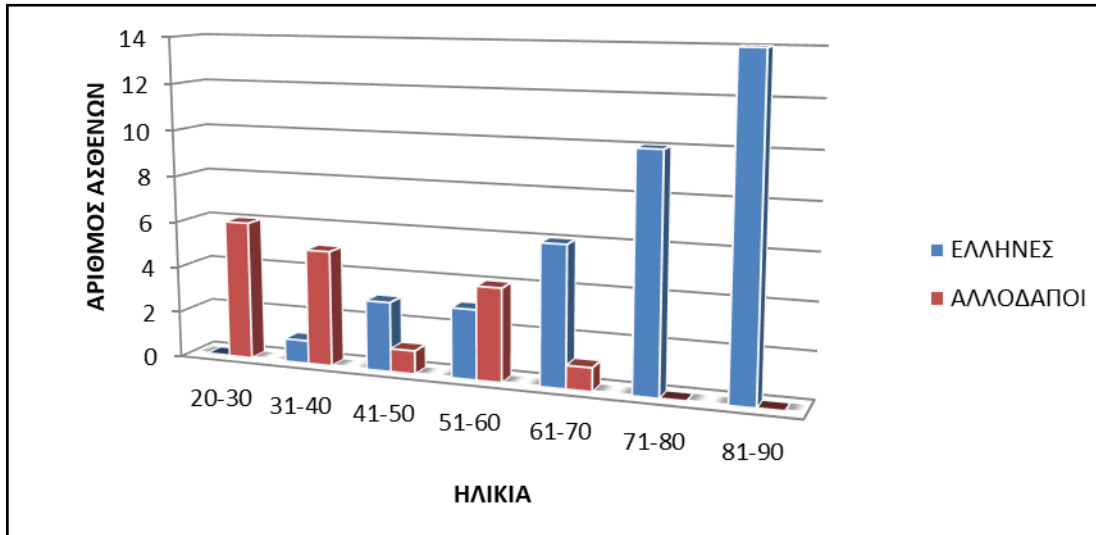
3.2.3 Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν τα 54 στελέχη που μελετήθηκαν

Τα 54 στελέχη απομονώθηκαν από ποικίλα κλινικά δείγματα ασθενών, άλλα κυρίως νοσηλευόμενων με πνευμονική φυματίωση. Ως εκ τούτου, η πλειονότητα των στελεχών προερχόταν από δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού (πτύελα, βρογχικές) άλλα και γαστρικό υγρό, με συνολικό ποσοστό 81,4%. Περισσότερο από το μισό αριθμό στελεχών *M. tuberculosis* Complex απομονώθηκε από πτύελα με ποσοστό 59,2%, ακολουθώντας οι βρογχικές εκκρίσεις με 11,1% και το γαστρικό υγρό με 7,3%. Τα εναπομείναντα δείγματα ήταν εξωπνευμονικής φυματίωσης: ούρα (11,1%), λεμφαδένες (3,7%), ιστός (1,9%), πλευριτικό υγρό (1,9%), FNA (1,9%), πύο (1,9%).

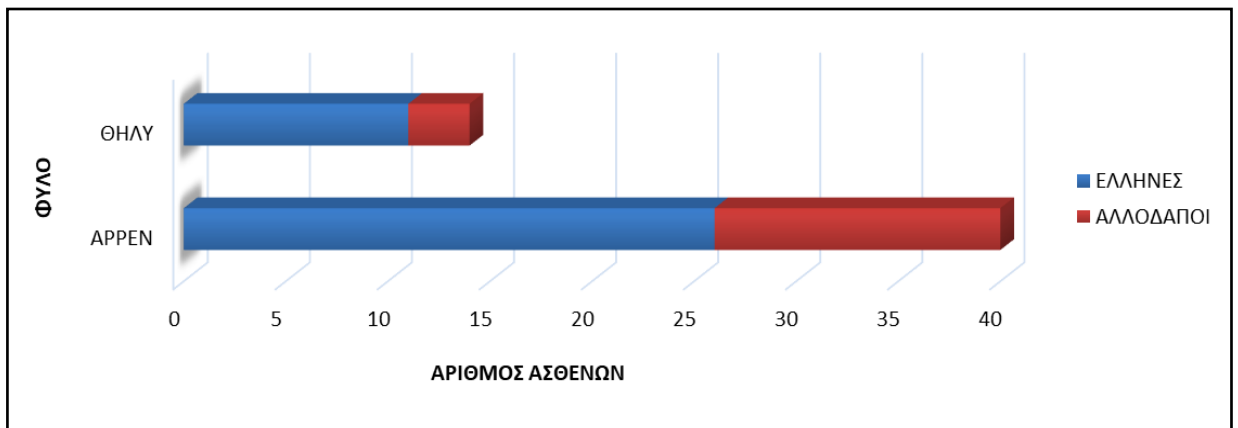
Όσον αφορά την προέλευση των στελεχών στην πλειοψηφία τους ανήκαν στις Πνευμονολογικές κλινικές με κυρίαρχη την Πνευμονολογική κλινική του ΠΓΝΛ (34/54), ακολουθώντας αριθμητικά του Γενικού Νοσοκομείου Λαμίας (7/54) και του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (2/54). Τα υπόλοιπα στελέχη του ΠΓΝΛ κατανέμονται στις διάφορες κλινικές με αύξουσα αριθμητική σειρά ως εξής; 6 στις Παθολογικές, 3 στην Ουρολογική, 1 στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (Μ.Ε.Θ.) και 1 στα Εξωτερικά Ιατρεία (Ε.Ι.).

Τα ανθεκτικά στελέχη απομονώθηκαν από 29 Έλληνες και 8 αλλοδαπούς, ενώ αντίστοιχα, τα ευαίσθητα στελέχη απομονώθηκαν από 8 Έλληνες και 9 αλλοδαπούς. Από τους 17 μετανάστες, οι περισσότεροι κατάγονταν από χώρες της Ευρώπης; 4 από Αλβανία, 3 από Βουλγαρία, 2 από Ρουμανία, 2 από Γεωργία και 1 από Ουκρανία. Οι υπόλοιποι προέρχονται από χώρες της Ασίας, 2 από Πακιστάν, 1 από Ρωσία, 1 από Ιράκ και 1 από Παλαιστίνη. Να σημειωθεί ότι οι δυο τελευταίοι ασθενείς ζούσαν σε ομαδική διαβίωση. Ο ασθενής από το Ιράκ ζούσε σε καταυλισμό προσφύγων και ο ασθενής από την Παλαιστίνη ήταν φυλακισμένος.

Το μεγαλύτερο ποσοστό (81,1%) των 37 Ελλήνων ασθενών ήταν άνω των 60 ετών (Γράφημα 3.2), ενώ το 70,6% των 17 αλλοδαπών ασθενών κυμαινόταν μεταξύ των ηλικιών 20 με 41. Οι περισσότεροι ασθενείς ήταν άνδρες (Γράφημα 3.3).



Γράφημα 3.2: Συγκριτική διακύμανση των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* Ελλήνων και αλλοδαπών ανά ηλικιακή ομάδα

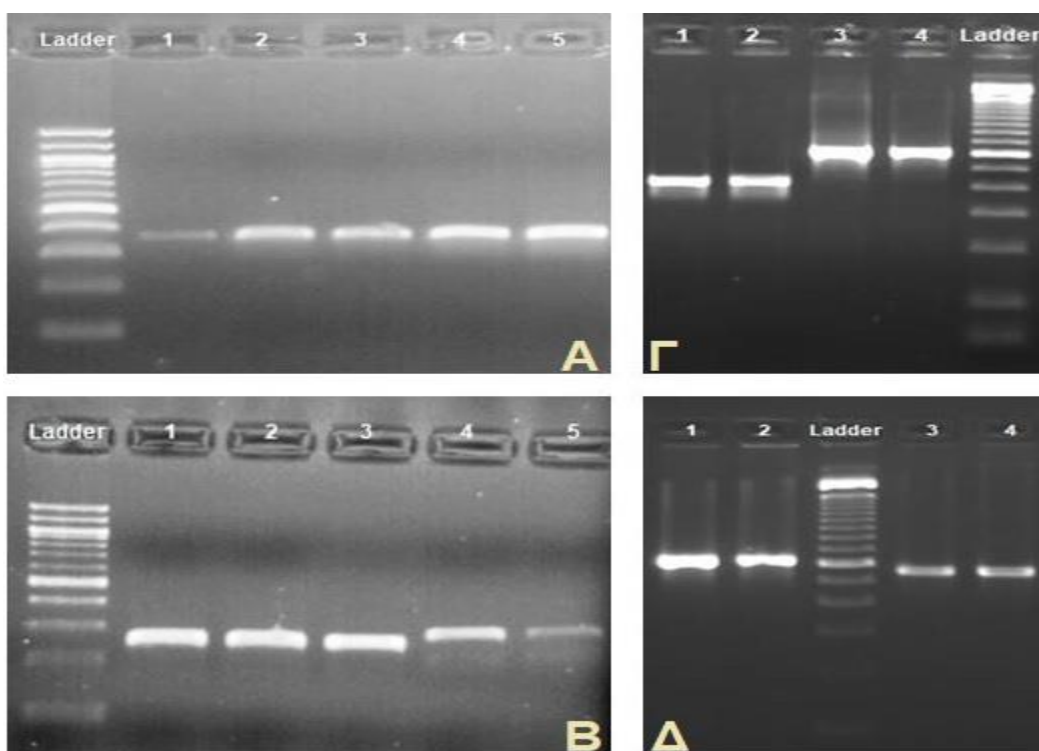


Γράφημα 3.3: Κυριαρχία της φυματίωσης σε άνδρες ασθενείς στους Έλληνες και στους αλλοδαπούς

3.3 Μοριακή τυποποίηση στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii*

3.3.1 Αποτελέσματα τυποποίησης των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* βάσει της μεθόδου MST

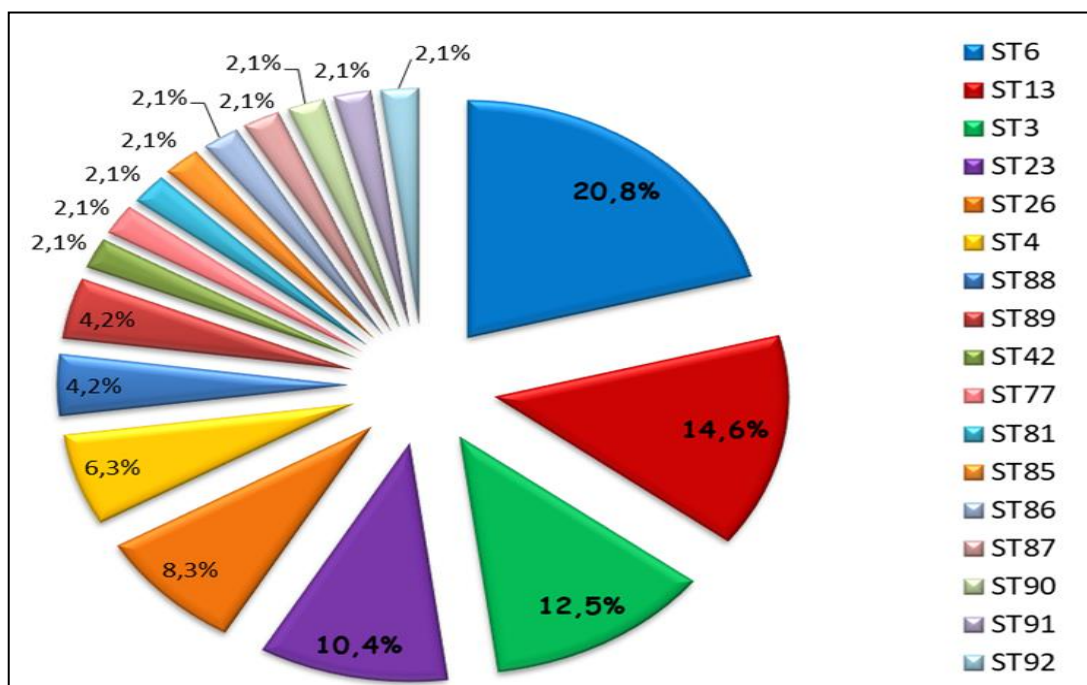
Αρχικά, ο χαρακτηρισμός των 48 στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MST, όπου ενισχύθηκαν οι οχτώ διαγονιδιακές διαχωριστικές περιοχές (MST1, MST2, MST3, MST4, MST8, MST11, MST12, MST13). Στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR αυτών των περιοχών.



Εικόνα 3.6: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση των οχτώ διαγονιδιακών διαχωριστικών περιοχών σε πήκτωμα αγαρόζης. Α. MST1 (βοθρία 1-3), MST2 (βοθρία 4-5), Β. MST3 (βοθρία 1-3), MST4 (βοθρία 4-5), MST1 (βοθρία 1-3), Γ. MST8 (βοθρία 1-2), MST11 (βοθρία 3-4), Δ. MST12 (βοθρία 1-2), MST13 (βοθρία 3-4)

Βάσει της μεθόδου MST, τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε 17 προφίλ ST (ST profiles) ή κλωνικοί τύποι ST, εκ των οποίων τα 8 προφίλ ST εμφανίζονται για πρώτη φορά (ST85,

ST86, ST87, ST88, ST89, ST90, ST91, ST92). Τα περισσότερα στελέχη ταξινομήθηκαν στους κλωνικούς τύπους ST6 (n=10), ST13 (n=7), ST3 (n=6), ST23 (n=5), ST26 (n=4) και ST4 (n=3). Τα υπόλοιπα δεκατρία στελέχη διανέμονται στους εξής κλωνικούς τύπους: ST88 (n=2), ST89 (n=2), ST42 (n=1), ST77 (n=1), ST81 (n=1), ST85 (n=1), ST86 (n=1), ST87 (n=1), ST90 (n=1), ST91 (n=1) και ST92 (n=1). Όλοι σχεδόν οι τύποι ST βρέθηκαν τόσο σε ανθεκτικά όσο και σε ευαίσθητα στελέχη. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των προφίλ ST και της αντοχής τους στα αντιφυματικά. Στο Γράφημα 3.4 φαίνονται τα ποσοστά των προφίλ ST στα 48 υπό μελέτη *M. tuberculosis*/*M. canettii* στελέχη.



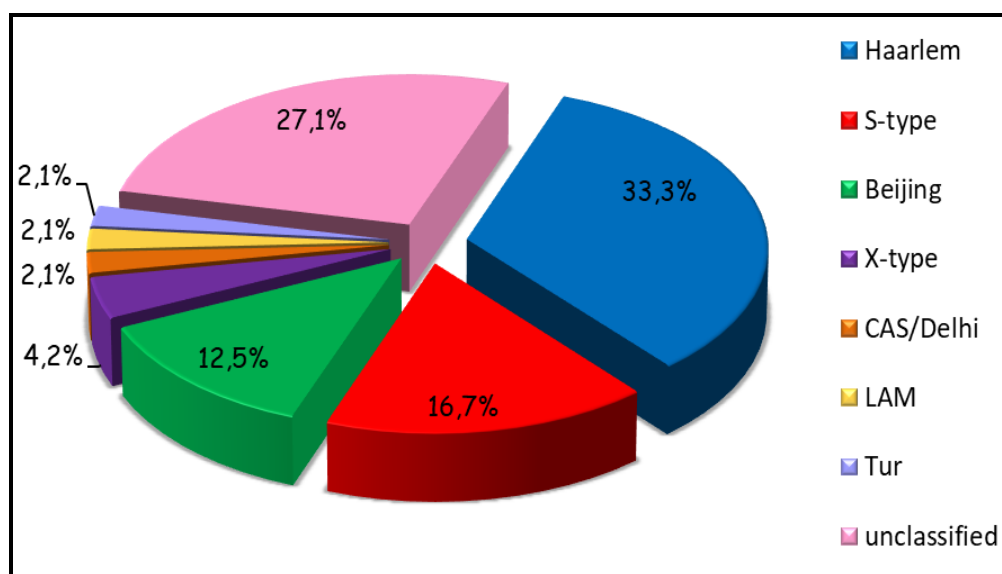
Γράφημα 3.4: Ποσοστά των 48 στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* ανά προφίλ ST

Τα MST groups αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα γενεαλογικές γραμμές (phylogeographical lineages). Στα στελέχη της παρούσας μελέτης επικρατεί η γενεολογία Euro-American (lineage 4), στην οποία ανήκουν οι κλωνικοί τύποι ST6, ST13, ST23, ST26, ST81, ST85, ST91 και ST92. Επίσης, προσδιορίστηκαν η γενεολογία East-Asian (lineage 2),

όπου ανήκει ο κλωνικός τύπος ST3. Τέλος, ο ST4 ανήκει είτε στην γενεολογία West-African1 (lineage 5) είτε στην γενεολογία Euro-American (lineage 4).

3.3.2 Αποτελέσματα τυποποίησης των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* βάσει της μεθόδου MIRU-VNTR

Για την τυποποίηση στελεχών χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η μέθοδος MIRU-VNTR. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν 8 διαφορετικούς γονότυπους στους οποίους ομαδοποιούνται τα 48 στελέχη *M. tuberculosis*/*M. canettii*. Ο επικρατών γονότυπος ήταν ο Haarlem (n=16, 33,3%). Τα εναπομείναντα στελέχη χαρακτηρίστηκαν από τους ακόλουθους γονότυπους S-type (n=8, 16,7%), Beijing (n=6, 12,5%), X-type (n=2, 4,2%), CAS/Delhi (n=1, 2,1%), LAM (n=1, 2,1%), Tur (n=1, 2,1%), και δεκατρία στελέχη αταξινόμητα (unclassified) (n=13, 27%). Ομοίως, όπως στην μέθοδο MST, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα, καθώς οι εκάστοτε γονότυποι εμφανίζονται τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη. Στο Γράφημα 3.5 απεικονίζονται τα ποσοστά στελεχών ανά MIRU-VNTR προφίλ.



Γράφημα 3.5: Ποσοστά των 48 στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii* ανά γονότυπο-οικογένεια βάση της μεθόδου MIRU-VNTR

3.3.3 Σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων τυποποίησης MST και MIRU-VNTR

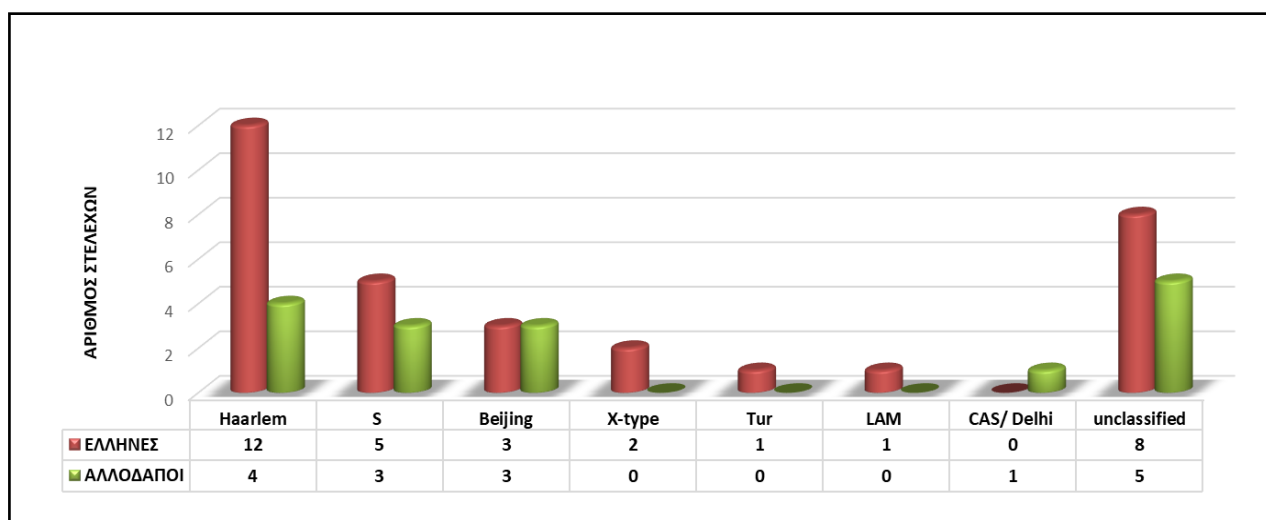
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των μεθόδων γονοτύπησης MIRU-VNTR και MST, παρατηρήθηκε ότι ομαδοποιούνται σε 17 προφίλ-κλωνικούς τύπους ST και 8 οικογένειες-γονοτύπους. Από τη σύγκριση προέκυψε επίσης ότι υπάρχει αντιστοιχία των προφίλ ST με συγκεκριμένες οικογένειες MIRU-VNTR, η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3 και κατ' επέκταση με τις γενεολογίες που ανήκουν.

MTBC	Προφίλ ST	Οικογένεια MIRU-VNTR	Γενεολογίες	Αριθμός στελεχών
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST3	Beijing	East-Asian or Lineage 2	6
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST6	Haarlem	Euro-American or Lineage 4	10
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST23	Haarlem	Euro-American or Lineage 4	5
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST85	Haarlem	Euro-American or Lineage 4	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST13	S-type	Euro-American or Lineage 4	7
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST91	S-type	Euro-American or Lineage 4	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST89	X-type	Euro-American or Lineage 4	2
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST87	CAS/Delhi	East-African-Indian or Lineage 3	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST92	LAM	Euro-American or Lineage 4	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST81	Tur	Euro-American or Lineage 4	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST26	unclassified	Euro-American or Lineage 4	4
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST77	unclassified	Euro-American or Lineage 4	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST4	unclassified	Euro-American or Lineage 4	3
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST86	unclassified	Euro-American or Lineage 4	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST88	unclassified	Euro-American or Lineage 4	2
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST90	unclassified	Euro-American or Lineage 4	1
<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ST42	unclassified	Euro-American or Lineage 4	1

Πίνακας 3.3: Σύγκριση και αντιστοίχιση προφίλ ST-οικογενειών MIRU-VNTR

Βάσει της τυποποίησης MIRU-VNTR, τα στελέχη μεταξύ των 16 αλλοδαπών ασθενών διανέμονται στους γονοτύπους Haarlem (25%), Beijing (19%), S-type (19%), CAS/ Delhi (6%) και αταξινόμητα στελέχη (31%). Παρατηρείται ελάχιστη υπερίσχυση του γονοτύπου Haarlem έναντι των Beijing και S-type, οι οποίοι συνεπικουρούν. Τα στελέχη

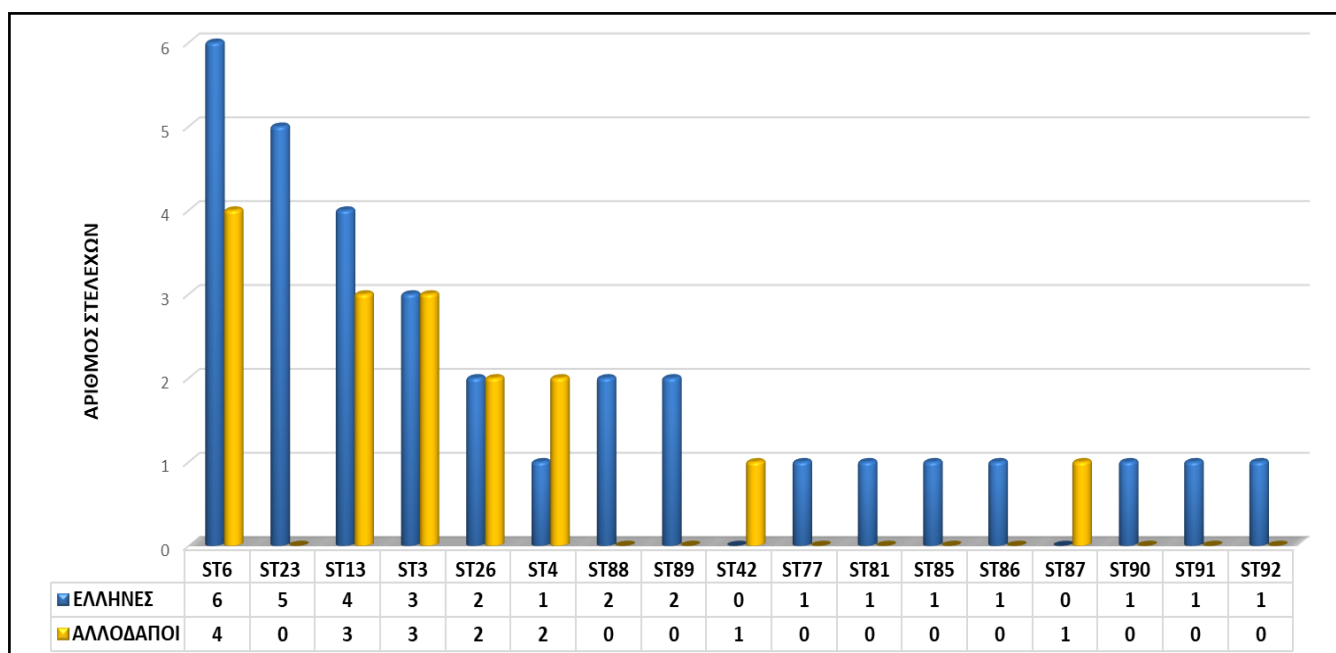
των 32 Ελλήνων ασθενών ανήκουν κυρίως στην οικογένεια Haarlem (38%) και ακολουθούν οι οικογένειες S-type (16%), Beijing (9%), X -type (6%), LAM (3%), Tur (3%) και unclassified (25%). Ομοίως, με τα στελέχη των αλλοδαπών, ο επικρατέστερος γονότυπος είναι ο Haarlem, με τη διαφορά ότι στους Έλληνες εμφανίζεται σε υψηλότερο ποσοστό, σχεδόν το ένα τρίτο των στελεχών. Μια άλλη ομοιότητα είναι ότι και στους δυο πληθυσμούς παρατηρείται υψηλό ποσοστό στελεχών που ανήκουν στις οικογένειες Beijing και S-type. Στο Γράφημα 3.6 παρουσιάζεται ο αριθμός των στελεχών που ανήκουν στις οικογένειες MIRU-VNTR συγκριτικά μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών.



Γράφημα 3.6: Σύγκριση του αριθμού των στελεχών μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών για τους διάφορους γονοτύπους

Όσον αφορά τη μέθοδο γονοτύπησης MST, η ποσοστιαία κατανομή των στελεχών, προερχόμενα από 16 αλλοδαπούς ασθενείς, ανά προφίλ ST είναι η ακόλουθη: ST6 (25%), ST3 (19%), ST13 (19%), ST26 (12.5%), ST4 (12.5%), ST42 (6%) και ST87 (6%). Βάση της σύγκρισης στην ενότητα 3.8, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα των επικρατέστερων κλωνικών τύπων είναι όμοια με της μεθόδου MIRU-VNTR. Συγκεκριμένα, κυρίαρχο είναι το προφίλ ST6 ακολουθώντας με ίδιο ποσοστό τα προφίλ ST3 και ST13. Στην κατανομή των στελεχών των 32 Ελλήνων ασθενών ο κυρίαρχος κλωνικός τύπος είναι ο ST6 (19%) με μικρή διαφορά από το προφίλ ST23 (16%). Εν συνεχεία, ακολουθούν με ποσοστό 13% και 9% τα προφίλ ST13 και προφίλ ST3 αντίστοιχα, με 6% το καθένα τα

προφίλ ST26, προφίλ ST88 και προφίλ ST89, και από 3% το καθένα τα προφίλ ST4, προφίλ ST77, προφίλ ST81, προφίλ ST85, προφίλ ST86, προφίλ ST90, προφίλ ST91 και προφίλ ST92. Παρατηρείται ότι όλα τα νέα προφίλ ST εκτός από το προφίλ ST87 προέρχονται από Έλληνες ασθενείς. Στους Έλληνες όπως και στους αλλοδαπούς κυρίαρχος κλωνικός τύπος είναι ο ST6. Μια σημαντική διαφορά είναι ότι το προφίλ ST23 απουσιάζει από τα στελέχη των αλλοδαπών, το οποίο είναι το δεύτερο πιο συχνό προφίλ ST στους Έλληνες. Τέλος, τα προφίλ ST3 και προφίλ ST13 βρίσκονται σε εξίσου υψηλό ποσοστό στους δυο πληθυσμούς. Στο Γράφημα 3.7 παρουσιάζεται ο αριθμός των στελεχών που ανήκουν στα προφίλ ST συγκριτικά μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών.

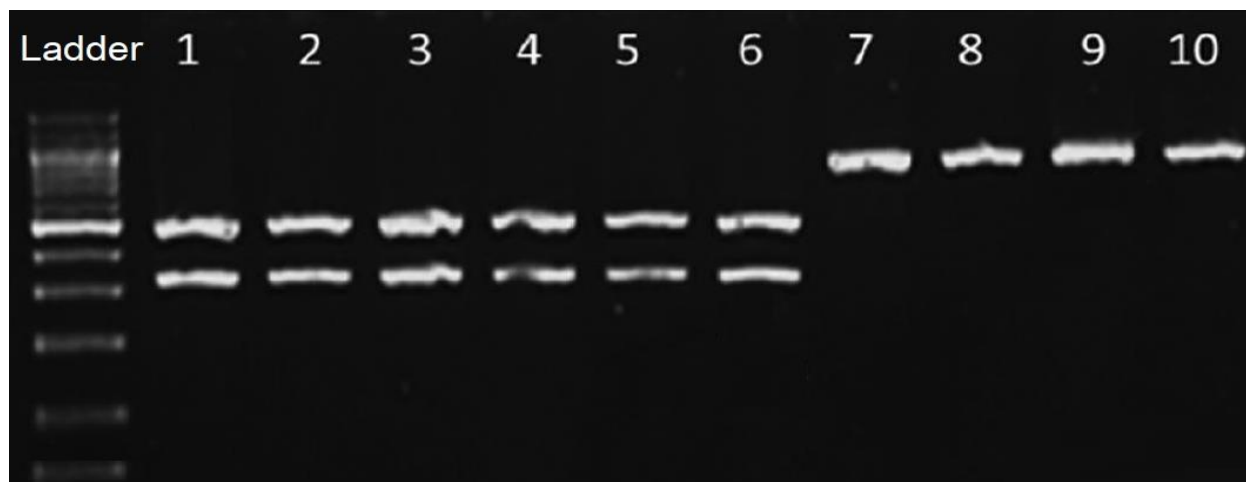


Γράφημα 3.7: Σύγκριση του αριθμού των στελεχών μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών για τα διάφορα προφίλ ST

3.3.4 Αποτελέσματα τυποποίησης στελεχών Beijing με RFLP-PCR

Τα στελέχη της οικογένειας Beijing χαρακτηρίζονται από υψηλή νοσηρότητα και μεταδοτικότητα. Για αυτό για επιβεβαίωση της τυποποίησης τους εφαρμόστηκε και μια τρίτη μέθοδος τυποποίησης με RFLP-PCR. Το ενισχυμένο γονίδιο Rv1245c πέπτεται με το ένζυμο περιορισμού XhoI μεταξύ των θέσεων 580 και 581 στα στελέχη μη Beijing.

Αντιθέτως τα στελέχη Beijing δεν πέπτονται λόγω της εισαγωγής μιας κυτοσίνης στο σημείο κοπής. Σε μόνο 6 στελέχη δεν έκοψε το ένζυμο περιορισμού, αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για στελέχη Beijing, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των μεθόδων τυποποίησης MST και MIRU-VNTR. Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση στελεχών Beijing και μη Beijing έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού XhoI.



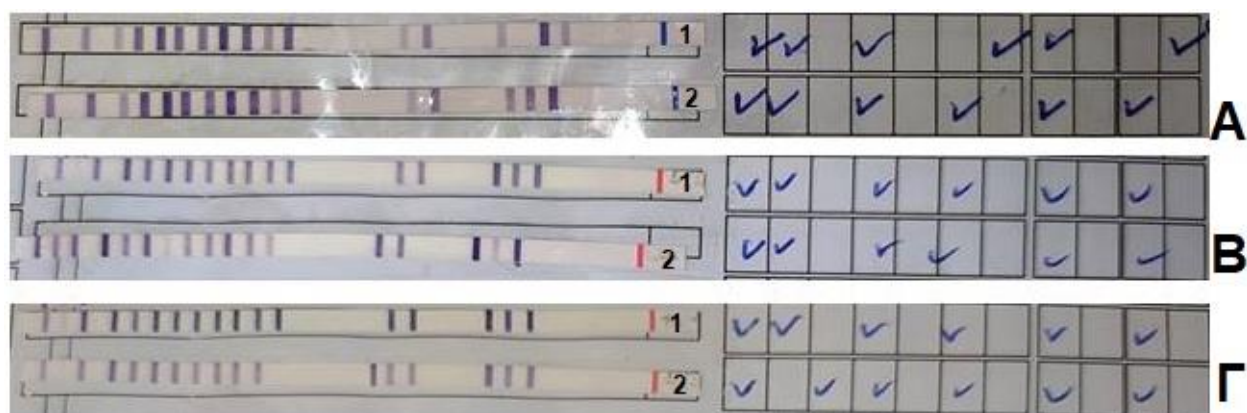
Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση πέψης ενδεικτικών προϊόντων PCR των στελεχών Beijing (1-6) και μη Beijing (7-10)

3.4 Χαρακτηρισμός μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα 1ης και 2ης γραμμής αντιφυματικά

3.4.1 Αποτελέσματα της εμπορικής δοκιμασίας MTBDRplus στην ανίχνευση της αντοχής σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη

Η εφαρμογή της εμπορικής δοκιμασίας GenoType Mycobacterium MTBDRplus (HAIN) στα 54 στελέχη της μελέτης έδειξε ότι στα 37 ανθεκτικά στελέχη, 1 στέλεχος με αντοχή στη ριφαμπικίνη έφερε τη μετάλλαξη S531L (ή αλλιώς S450L) στο γονίδιο *rpoB*, ενώ, από τα 14 στελέχη *M. tuberculosis* Complex με αντοχή στην ισονιαζίδη, σε δυο στελέχη με χαμηλού επιπέδου ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη c-15t στο γονίδιο *inhA* και σε δυο στελέχη

με υψηλού επιπέδου αντοχή η μετάλλαξη S315T στο γονίδιο *katG*. Σε κανένα από τα ευαίσθητα στελέχη στην ισονιαζίδη και στην ριφαμπικίνη δεν βρέθηκε κάποια από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύει η εμπορική δοκιμασία. Συμπερασματικά, το ποσοστό ανίχνευσης των πιο συχνών μεταλλάξεων σχετιζόμενων με αντοχή στην ισονιαζίδη ήταν χαμηλό (28,6%) στα στελέχη της μελέτης μας. Άλλωστε η απουσία μεταλλάξεων σε ανθεκτικά στελέχη αποτέλεσε το έναυσμα για τον σχεδιασμό της παρούσας μελέτης. Στην Εικόνα 3.8 φαίνονται οι ταινίες υβριδοποίησης με τις χαρακτηριστικές ζώνες σε περίπτωση ευαισθησίας και αντοχής σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη.



Εικόνα 3.8: Ενδεικτικά αποτελέσματα ταινιών υβριδοποίησης του κιτ GenoType Mycobacterium MTBDRplus, όπου φαίνεται ο χρωματισμός των ζωνών σε ευαίσθητα στελέχη (A1,B1,Γ1) και σε στελέχη με αντοχή σε ισονιαζίδη (A2,B2) και σε ριφαμπικίνη (Γ2)

3.4.2 Ευρύς μοριακός έλεγχος των γονιδίων αντοχής των στελεχών *M. tuberculosis/*

M. canettii

3.4.2α Αντοχή σε ισονιαζίδη

3.4.2α1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *katG*

Από τη αλληλούχηση του γονιδίου *katG* προέκυψαν μεταλλάξεις στα τέσσερα στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή και σε δυο με χαμηλού επιπέδου αντοχή στη ισονιαζίδη. Στα στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή προσδιορίστηκαν οι μη συνώνυμες

μεταλλάξεις S315T (g944c: AGC→ACC) (n=2), W777stop (g1431a: TGG→TGA) (n=1), D74N (g220a: GAC→AAC) (n=1), R463L(g1388t: CGG→CTG) (n=1) και η συνώνυμη μετάλλαξη A162 (g486a: GCG→GCA) (n=1). Σε δυο από τα τέσσερα στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή βρέθηκαν διπλές μεταλλάξεις. Το ένα στέλεχος (LAR325) έφερε τις μεταλλάξεις S315T και R463L, ενώ το άλλο (LAR361) την μη συνώνυμη μετάλλαξη D74N και τη συνώνυμη υποκατάσταση A162. Στα δυο στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στη ισονιαζίδη βρέθηκαν: η μη συνώνυμη μετάλλαξη G691S (g2071a: GGC→AGC) στο πρώτο στέλεχος (LAR267) και η συνώνυμη E399 (a1197g: GAA→GAG) στο δεύτερο στέλεχος (LAR240). Οι μεταλλάξεις D74N και G691S βρέθηκαν για πρώτη φορά και κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank και τους δόθηκαν οι αριθμοί υποβολής (accession numbers) MT497914 και MT497915, αντίστοιχα. Μια άλλη σημαντική παρατήρηση ήταν ότι όλα στελέχη (ευαίσθητα και ανθεκτικά) των οικογενειών Beijing και CAS/Delhi και οι κλωνικοί τύποι ST3 και ST87 έφεραν τη μετάλλαξη R463L. Τα υπόλοιπα στελέχη δεν είχαν μεταλλαγές στο γονίδιο *katG* (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α2Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *inhA* και του προαγωγέα του

Σε τέσσερα στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή βρέθηκαν μεταλλάξεις στον προαγωγέα και στη δομική περιοχή του γονιδίου *inhA*. Οι δυο υποκαταστάσεις c-15t και c-17t βρέθηκαν στον προαγωγέα του γονιδίου *inhA*. Η μετάλλαξη c-15t παρουσιάστηκε σε δυο στελέχη, εκ των οποίων το ένα (LAR267) έφερε μια επιπρόσθετη μετάλλαξη στο γονίδιο *katG* (G691S). Στο γονίδιο *inhA* ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη S94A (t280g:TCG→GCG) σε ένα (LAR240) από τα στελέχη με αντοχή στην ισονιαζίδη, το οποίο είχε ταυτόχρονα τη σιωπηλή μετάλλαξη E399 στο γονίδιο *katG*. Σε κανένα άλλο στέλεχος με αντοχή και ευαισθησία στην ισονιαζίδη δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις ούτε στον προαγωγέα ούτε στη δομική περιοχή του γονιδίου *inhA* (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α3 Αποτελέσματα ενίσχυσης του *mabA* γονιδίου

Στο γονίδιο *mabA* ανιχνεύτηκε η συνώνυμη μετάλλαξη L203 (g609a: CTG→CTA) σε δυο στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη. Στα δυο στελέχη, οι μεταλλάξεις που έφεραν στα υπόλοιπα γονίδια σχετιζόμενα με αντοχή στην ισονιαζίδη εμφανίζονταν τόσο σε ευαίσθητα στελέχη όσο και σε ανθεκτικά στελέχη. Κανένα άλλο από τα ανθεκτικά στελέχη και ευαίσθητα στελέχη δεν έφερε αλλαγή στο γονίδιο *mabA* (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α4 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *ahpC* και του προαγωγέα αυτού

Σε τρία στελέχη με αντοχή στην ισονιαζίδη ανιχνεύτηκαν διαφορετικού τύπου μεταλλάξεις στη περιοχή προαγωγέα του γονιδίου *ahpC*. Δύο από τα στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη είχαν μεταλλάξεις ταυτόχρονα και στο γονίδιο *katG*. Το ένα στέλεχος (LAR277) με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη έφερε την υποκατάσταση g-48a στην διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* και ταυτόχρονα την μεταλλαγή S315T στο γονίδιο *katG*. Το δεύτερο στέλεχος (LAR253) είχε την υποκατάσταση c-54t στην διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* και την υποκατάσταση W477stop στο γονίδιο *katG*. Η τρίτη μετάλλαξη βρέθηκε σε στέλεχος (LAR458) με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη και ήταν μετάλλαξη μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, συγκεκριμένα ένθεση αδενίνης σε θέση 85 νουκλεοτιδίων πριν το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου *ahpC* (A-85ins). Πρόκειται για νέα μεταλλαγή στη βιβλιογραφία, η οποία κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GenBank και έχει αριθμό υποβολής (accession numbers) MT497916. Μόνο σε ένα ευαίσθητο στέλεχος στην ισονιαζίδη (LAR266), που ανήκε στην οικογένεια CAS/Delhi και είχε προφίλ ST87, προσδιορίστηκαν οι υποκαταστάσεις g-88a και a-80g. Η μεταλλαγή a-80g της διαγονιδιακής περιοχής *oxyR-ahpC* αναφέρεται για πρώτη φορά (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α5 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *nat*

Στα στελέχη με αντοχή στην ισονιαζίδη προσδιορίστηκαν τρεις μεταλλάξεις, δυο μη συνώνυμες D171G (a512g: GAC→GGC) και G207R (g619a: GGA→AGA), και μια σιωπηλή A196 (c588t: GCC→CCT). Η πρώτη μετάλλαξη (D171G) βρέθηκε σε ένα στέλεχος (LAR253) με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη και με επιπρόσθετες μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* (W477stop) και τη διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* (c-54t). Η μετάλλαξη D171G παρουσιάστηκε πρώτη φορά και κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GenBank με αριθμό υποβολής MT497917. Η σιωπηλή μετάλλαξη A196 συνυπάρχει με τη μετάλλαξη μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου A-85ins στη διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* σε στέλεχος (LAR458) με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη. Η τρίτη υποκατάσταση G207R βρέθηκε σε τέσσερα ανθεκτικά στελέχη και σε τέσσερα ευαίσθητα στελέχη. Το σημαντικό εύρημα είναι ότι έφεραν αυτή τη μεταλλαγή όλα τα στελέχη της οικογένειας S-type και των κλωνικών τύπων ST13 και ST91 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α6 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *mshA*

Στο γονίδιο *mshA* βρέθηκαν δυο μεταλλάξεις, A187V (c560t:GCA→GTA) και N111S (a332g:AAC→AGC), σε στελέχη με αντοχή άλλα και ευαισθησία στην ισονιαζίδη. Σπουδαία ήταν η παρατήρηση της παρουσίας της μεταλλαγής A187V σε όλα τα στελέχη γονοτύπου Beijing και προφίλ ST3. Ομοίως, η εμφάνιση της μετάλλαγης N111S σε όλα τα στελέχη με γονότυπο Haarlem, προφίλ ST6 και προφίλ ST23. Τέλος, βρέθηκε μια συνώνυμη μετάλλαξη L244 (c730t: CTG→TTG) σε ευαίσθητο στην ισονιαζίδη στέλεχος (LAR258) στο γονίδιο *mshA* (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α7 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *ndh*

Στα στελέχη με αντοχή στην ισονιαζίδη βρέθηκαν μια μη συνώνυμη μετάλλαξη V18A (t53g: GTG→ GCG) και μια συνώνυμη μετάλλαξη S124 (t372c: TCT→TCA). Πέντε ανθεκτικά στελέχη έφεραν την αλλαγή V18A, άλλα και τέσσερα ευαίσθητα στελέχη στην

ισονιαζίδη. Να σημειωθεί ότι όλα τα εννιά στελέχη ανήκαν στην οικογένεια S-type και στους κλωνικούς τύπους ST13 και ST91. Η σιωπηλή υποκατάσταση S124 βρέθηκε σε στέλεχος με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη (L306) και έφερε ταυτόχρονα υποκατάσταση στο προαγωγέα του γονιδίου *inhA* (c-17t) (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α8 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *accD6*

Στο *accD6* γονίδιο, προσδιορίστηκε η μετάλλαξη D229G (a686g:GAC→GGC) σε ένα ανθεκτικό στην ισονιαζίδη στέλεχος. Ωστόσο, η συγκεκριμένη αλλαγή εμφανίστηκε σε πέντε ευαίσθητα στελέχη στην ισονιαζίδη. Τα έξι αυτά στελέχη είχαν γονότυπο Beijing και προφίλ ST3 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β)

3.4.2α9 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *srmR homolog*

Στο *srmR homolog* γονίδιο, σε ένα μόνο στέλεχος (L306) με αντοχή στην ισονιαζίδη βρέθηκε μια συνώνυμη μετάλλαξη K367 (g1101a: AAG→AAA), το οποίο έφερε ταυτόχρονα μη συνώνυμη μετάλλαξη στον προαγωγέα του γονιδίου *inhA* (c-17t) και σιωπηλή μεταλλαγή στο γονίδιο *ndh* (S124). Σε ένα ευαίσθητο στέλεχος (LAR266) βρέθηκε η υποκατάσταση M323T (t968c: ATG→ACG) στο γονίδιο *srmR homolog* και το οποίο ανήκει στην οικογένεια CAS/Delhi και είχε προφίλ ST87 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β)

3.4.2α10 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *Rv1592c*

Η νουκλεοτιδική ανάλυση του γονιδίου *Rv1592c* έδειξε ταυτόχρονα μια σιωπηλή υποκατάσταση E321 (a963g:GAA→GAG) και μια μη συνώνυμη αλλαγή I322V(a964g:ATT→GTT) τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη. Αυτή η διπλή μετάλλαξη εμφανίστηκε σε όλα τα στελέχη των οικογενειών Beijing, Haarlem, CAS/Delhi, X-type καθώς και στο αταξινομητο (unclassified), και των κλωνικών τύπων ST3, ST6, ST23, ST85, ST87, ST77, ST89 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2α11 Αποτελέσματα ενίσχυσης των γονιδίων *efpA*, *kasA*, *fbpC*, *fabD*, *Rv1772* και *fadE24*

Στο *efpA* γονίδιο, δεν υπήρξε μετάλλαξη στα ανθεκτικά στελέχη στην ισονιαζίδη. Μια μοναδική και νέα αντικατάσταση, η A10G (c29g: GCG→GGG), βρέθηκε σε ένα στέλεχος (LAR364) ευαίσθητο στην ισονιαζίδη άλλα ανθεκτικό στην αιθαμβουτόλη. Πρόκειται για στέλεχος που ανήκει στην οικογένεια LAM και έχει προφίλ ST92. Το στέλεχος κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GenBank με αριθμό υποβολής MT497918 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

Τέλος, στα γονίδια *kasA*, *fbpC*, *fabD*, *Rv1772*, *fadE24*, *oxyR*, *furA* δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις ούτε στα ανθεκτικά ούτε στα ευαίσθητα στελέχη στην ισονιαζίδη.

3.4.2β Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής κοινών στη ισονιαζίδη και στην αιθαμβουτόλη των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii*

Όπως προαναφέρθηκε, οι μεταλλάξεις των γονιδίων του οπερονίου *iniBAC* καθώς και του γονιδίου *Rv0340* που βρίσκεται ανοδικά του οπερονίου και μεταγράφεται μαζί με αυτό, έχουν συσχετιστεί με αντοχή στην ισονιαζίδη και στην αιθαμβουτόλη.

3.4.2β1 Αποτελέσματα ενίσχυσης των γονιδίου του οπερονίου *iniBAC*

Το οπερόνιο *iniBAC*, κωδικοποιείται από τα γονίδια *iniA*, *iniB* και *iniC*, όπως προαναφέρθηκε. Κανένα από τα ανθεκτικά στελέχη στην ισονοζιάδη και στην αιθαμβουτόλη, καθώς και τα ευαίσθητα δεν έφεραν υποκατάσταση στα γονίδια *iniB* και *iniC*.

Στο γονίδιο *iniA*, βρέθηκαν τρεις διαφορετικές μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι δυο ήταν παρούσες μόνο σε ευαίσθητα στελέχη στην ισονιαζίδη και στην αιθαμβουτόλη. Αυτές ήταν οι νέες μεταλλαγές V33G (t98g: GTC→GGC) και L589V (c1765g: CTG→GTG), οι οποίες κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank και έχουν αριθμούς υποβολής MT538276 και

MT538277, αντίστοιχα. Η υποκατάσταση V33G παρουσιάστηκε στο στέλεχος (LAR235) με αντοχή στη ριφαμπικίνη, ήταν «αταξινόμητο» και με προφίλ ST77, ενώ η L589V στο στέλεχος (LAR266) με αντοχή στη στρεπτομυκίνη και είχε προφίλ ST87 και γονότυπο CAS/Delhi. Η τρίτη ήταν σιωπηλή μετάλλαξη G155 (t534c:GGT→GGC), βρέθηκε τόσο σε ανθεκτικά όσο και σε ευαίσθητα στελέχη στην ισονιαζίδη, άλλα σε κανένα στέλεχος ανθεκτικό στην αιθαμβουτόλη. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η σιωπηλή αυτή υποκατάσταση ήταν παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη της οικογένειας S-type και των κλωνικών τύπων ST13 και ST91 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.2β2 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *Rn0340*

Σχετικά με τα ανθεκτικά στελέχη στην ισονιαζίδη, κανένα δεν παρουσιάζει υποκατάσταση στο γονίδιο *Rn0340*. Ενώ, σε ένα (LAR364) από τα τρία στελέχη με αντοχή στην αιθαμβουτόλη βρέθηκε η συνώνυμη μετάλλαξη I30 (c90t: ATC→ATT). Το στέλεχος αυτό ανήκει στην οικογένεια LAM και έχει προφίλ ST92. Τέλος, ένα στέλεχος (LAR408) ευαίσθητο στην ισονιαζίδη και στη ριφαμπικίνη έφερε τη σιωπηλή μετάλλαξη E17 (a51g: GAA→GAG), οποία ήταν νέα μετάλλαξη με αριθμό υποβολής MT538284 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

Όσον αφορά τα στελέχη με αντοχή στην ισονιαζίδη παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου όλων των σχετιζόμενων γονιδίων. Συνοψίζοντας, από τα 14 στελέχη με αντοχή στην ισονιαζίδη 11 (78,6%) έφεραν μεταλλάξεις οι οποίες βρέθηκαν μόνο σε ανθεκτικά στελέχη. Συγκεκριμένα, έξι στελέχη (42,8%) παρουσίασαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* (εκ των οποίων η μια ήταν σιωπηλή), τρία στελέχη (21,4%) στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *inhA*, τρία στελέχη (21,4%) στην διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC*, ένα στέλεχος (7,1%) στη δομική περιοχή του γονιδίου *inhA* και δυο (14,3%) στο γονίδιο *mabA*. Ένα στέλεχος έφερε ταυτόχρονα μεταλλάξεις στο *katG* και στην διαγονιδιακή περιοχή *mabA-inhA*, ενώ δυο στελέχη στο *katG* και στην διαγονιδιακή

περιοχή *oxyR-ahpC*. Σε τρία στελέχη δεν βρέθηκε καμία μετάλλαξη σχετιζόμενη με αντοχή στην ισονιαζίδη.

3.4.γ Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη αιθαμβουτόλη των στελεχών *M.*

tuberculosis/ M. canettii

3.4.γ1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *embB*

Στο γονίδιο *embB*, κανένα από τα τρία στελέχη με αντοχή στην αιθαμβουτόλη δεν έφερε μεταλλάξεις. Ωστόσο, σε ένα ευαίσθητο στέλεχος (LAR325) στην αιθαμβουτόλη, άλλα με αντοχή στην ισονιαζίδη, βρέθηκε η μετάλλαξη M306I (g918c: ATG→ATC). Το στέλεχος ανήκε στην οικογένεια Beijing και είχε προφίλ ST3 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

Ανακεφαλαιώνοντας, από το μοριακό έλεγχο των γονιδίων αντοχής στην αιθαμβουτόλη δεν προέκυψε μη συνώνυμη μετάλλαξη στα γονίδια *embB*, *iniA*, *iniB*, *iniC* και *Rn0340*. Μόνο σε μια σιωπηλή μετάλλαξη (I30) παρατηρήθηκε σε ένα στέλεχος με αντοχή στην αιθαμβουτόλη της οικογένειας LAM και με προφίλ ST92, και η οποία πιθανώς δεν σχετίζεται με την εμφάνιση της αντοχής.

3.4.δ Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη ριφαμπικίνη των στελεχών *M.*

tuberculosis/ M. canettii

Η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *rpoB*, που σχετίζεται με αντοχή στην ριφαμπικίνη πραγματοποιήθηκε σε όλα τα 54 στελέχη. Το ένα και μοναδικό στέλεχος με αντοχή στην ριφαμπικίνη έφερε τη μετάλλαξη S450L (c1349t: TCG→TTG). Σε ένα στέλεχος ευαίσθητο (LAR265) στην ριφαμπικίνη, άλλα με αντοχή στην ισονιαζίδη, παρουσιάστηκε η

υποκατάσταση I491F (t1471c: ATC→TTC). Τα υπόλοιπα πενήντα δύο στελέχη δεν παρουσίασαν νουκλεοτιδικές αλλαγές στο *rpoB* γονίδιο (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.ε Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη πυραζιναμίδη των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii*

Σε όλα τα 48 στελέχη ενισχύθηκαν τα γονίδια *pnxA*, *rpsA* και *ranD* που σχετίζονται με αντοχή στην πυραζιναμίδη.

3.4.ε1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *pnxA*

Από τα τέσσερα στελέχη *M. tuberculosis*/*M. canettii* με αντοχή στην πυραζιναμίδη μόνο στο ένα βρέθηκε η μετάλλαξη L182W (t545g:TTG→TGG) στο γονίδιο *pnxA*. Τα υπόλοιπα τρία στελέχη με αντοχή στην πυραζιναμίδη δεν έφεραν καμία μετάλλαξη στο γονίδιο *pnxA*. Όσον αφορά τα ευαίσθητα στελέχη στην πυραζιναμίδη, σε ένα στέλεχος (LAR266) παρατηρήθηκε η συνώνυμη μετάλλαξη S65 (c195t: TCC→TCT), το οποίο ανήκει στην οικογένεια CAS/Delhi και έχει προφίλ ST87 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.ε2 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *rpsA*

Σε κανένα από τα τέσσερα στελέχη με αντοχή στην πυραζιναμίδη δεν ανιχνεύτηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *rpsA*. Σε έξι ευαίσθητα στελέχη στην πυραζιναμίδη βρέθηκε η συνώνυμη μετάλλαξη A212 (a636c: CGA→CGC) στο γονίδιο *rpsA*. Παρατηρήθηκε ότι τα αυτά στελέχη είχαν γονότυπο Beijing και προφίλ ST3 (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.ε3 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *panD*

Σχετικά με το γονίδιο *panD*, δεν παρουσιάστηκε καμία μη συνώνυμη μετάλλαξη στα τέσσερα στελέχη με αντοχή στην πυραζιναμίδη. Μόνο ένα στέλεχος ευαίσθητο στην πυραζιναμίδη (LAR458) είχε μια σιωπηλή μετάλλαξη την S25 (c195t: TCC→TCT) (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

Συγκεντρωτικά, από το μοριακό έλεγχο των τριών γονιδίων αντοχής στην πυραζιναμίδη προέκυψε μόνο ένα στέλεχος με μετάλλαξη (L182W) στο γονίδιο *panD*. Τα τρία εναπομείναντα στελέχη δεν έφεραν καμία μετάλλαξη στα γονίδια *rpsA*, *rhoA* και *panD*.

3.4.στ Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στη στρεπτομυκίνη των στελεχών *M. tuberculosis*/*M. canettii*

Ο έλεγχος αντοχής στην στρεπτομυκίνη πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση των γονιδίων *rrs*, *rpsL* και *gidB* που συνδέονται με αντοχή σε αυτό το (δεύτερης γραμμής) αντιφυματικό φάρμακο.

3.4.στ1 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *rrs*

Δεν ανιχνεύτηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο *rrs* τόσο σε ανθεκτικά όσο και σε ευαίσθητα στην στρεπτομυκίνη στελέχη (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.στ2 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *rpsL*

Από την μοριακή ανάλυση του γονιδίου *rpsL*, προέκυψε η μετάλλαξη K43R (a128g: AAG→AGG) σε τρία από τα δεκαέξι στελέχη με αντοχή στην στρεπτομυκίνη. Τα στελέχη

που φέρουν την αλλαγή K43R οδήγησαν όλα σε υψηλού επιπέδου αντοχή στη στρεπτομυκίνη. Επιπροσθέτως, δυο εκ των τριών στελεχών ήταν γονότυπος Beijing και προφίλ ST3. Στα υπόλοιπα στελέχη με αντοχή άλλα και με ευαισθησία δεν παρατηρήθηκε κάποια υποκατάσταση (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

3.4.στ3 Αποτελέσματα ενίσχυσης του γονιδίου *gidB*

Όσον αφορά τα δεκαέξι στελέχη με αντοχή στην στρεπτομυκίνη, όλα εκτός από ένα στέλεχος εμφάνισαν μεταλλάξεις. Όπως προαναφέρθηκε, στην στρεπτομυκίνη πέντε στελέχη είχαν χαμηλού επιπέδου αντοχή και έντεκα υψηλού επιπέδου αντοχή. Όλα τα (έντεκα) στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *gidB*. Τα εννέα από τα έντεκα αυτά στελέχη παρουσίαζαν τις ακόλουθες αντικαταστάσεις βάσεων: H48Q (t144a:CAT→CAA), G42S (g142t:GGT→AGT), G73V (g218t:GGG→GTG), V65G (t195g:GTC→GGC), V177L (g529c: GTG→CTG), A138E (c413a:GCG→GAG), T146R (c437g:ACG→AGG), E92D (a276c:GAA→GAC) και μια συνώνυμη μετάλλαξη A205 (a615g:GCA→GCG). Οι μεταλλάξεις V65G και V177L συνυπήρχαν στο ίδιο στέλεχος (LAR232). Τα υπόλοιπα δυο στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη παρουσίασαν μετάλλαξη μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, το ένα στέλεχος (LAR438) έφερε διαγραφή μιας βάσης της κυτοσίνης στην νουκλεοτιδική θέση 61 (c61del). Στο δεύτερο στέλεχος (LAR449) βρέθηκε έλλειψη δέκα νουκλεοτιδίων (tgtggagcgg) από τη θέση 90 έως 99 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας [(tgtggagcgg)90-99del] και ταυτόχρονα μια σιωπηλή μετάλλαξη R175 (g525c:CGG→CGC). Οι υποκαταστάσεις E92D και A205 συνυπήρχαν σε δυο διαφορετικά ανθεκτικά στελέχη. Το αξιοσημείωτο είναι ότι και τα δυο αυτά στελέχη έφεραν ταυτόχρονα μετάλλαξη στο γονίδιο *rpsL*, ανήκαν στην οικογένεια Beijing και είχαν προφίλ ST3. Η παρουσία των διπλών μεταλλάξεων E92D και A205 παρατηρήθηκε και στα υπόλοιπα τέσσερα στελέχη Beijing και με προφίλ ST3, τα οποία ήταν ευαίσθητα στην στρεπτομυκίνη.

Τρία από τα πέντε με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην στρεπτομυκίνη στελέχη είχαν μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου, συγκεκριμένα διαγραφή μιας βάσης. Τα δύο από τα τρία στελέχη είχαν διαγραφή γουανίνης στην νουκλεοτιδική θέση 102

(g102del) του γονιδίου *gidB*, ενώ στο τρίτο στέλεχος απουσίαζε η κυτοσίνη από τη νουκλεοτιδική θέση 115 (c115del). Στο ένα στέλεχος (LAR266) με διαγραφή g102del βρέθηκε επιπλέον η σιωπηλή μετάλλαξη A205 (a615g:GCA→GCG), ανήκε στην οικογένεια CAS και ήταν ST87. Η μετάλλαξη g102del είναι γνωστό ότι δεν προσδίδει αντοχή στην ισονιαζίδη διότι έχει ανιχνευτεί και σε ευαίσθητα στελέχη. Το τέταρτο στέλεχος με χαμηλού επιπέδου αντοχή εμφάνισε διπλή μετάλλαξη, παρουσιάζοντας ταυτόχρονα τη μη συνώνυμη A53D (c158a:GCC→GAC) και τη συνώνυμη μετάλλαξη S70 (c210t:AGC→AGT).

Ένα μόνο ευαίσθητο στέλεχος εμφάνισε μετάλλαξη στο γονίδιο *gidB*, την L16R (t47g: CTT→CGT), το οποίο ανήκε στην οικογένεια LAM και είχε προφίλ ST92. Αυτό ανήκε στην οικογένεια CAS/Delhi και είχε προφίλ ST87.

Σημαντικό είναι ότι οι δυο μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου (tgtggagcgg)90-99del και c61del καθώς και οι μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσεων A53D, G73V, V177L, G42S, T146R δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως (GenBank αριθμό υποδοχής: MT538289, MT538288, MT538279, MT538281, MT538283, MT538278, MT538280, αντιστοίχως). Επιπλέον, αριθμούς υποδοχής στην βάση δεδομένων GenBank MT538285, MT538282, MT538286, MT538287, απέκτησαν οι μεταλλάξεις H48Q, A138E, c115del, g102del/A205, αντίστοιχα (Πίνακας 3.4α και Πίνακας 3.4β).

Συνοψίζοντας, από τα δεκαέξι στελέχη με αντοχή στην στρεπτομυκίνη, τρία στελέχη (18,8%) στο γονίδιο *rpsL* και δέκα στελέχη (62.5%) στο γονίδιο *gidB* έφεραν μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αντοχή, ενώ κανένα στέλεχος στο γονίδιο *rrs*. Τέλος, σε τρία στελέχη (18,8%) δεν βρέθηκαν καθόλου μεταλλάξεις σχετιζόμενες από το μοριακό έλεγχο των τριών αυτών γονιδίων.

No TB	Χώρα καταγωγής	Φύλο	Ηλικία	Βιολογικό υλικό	Ημερομηνία απομόνωσης	Φαινότυπος	Προφύλ ST	MIRU-VNTR οικογένεια	Μεταλλάξεις συσχετιζόμενες με ανοχή	Μεταλλάξεις που δεν οδήγησαν σε φαινοτυπική ανοχή
LAR221	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	79	πτύελα	2009	INH-L	ST13	S	<i>mabA</i> : L203	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR240	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	74	βρογχικές	2010	INH-L	ST88	unclassified	<i>katG</i> : E399/ <i>inhA</i> : S94A	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR255	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	APPEN	25	πτύελα	2010	INH-L	ST6	Haarlem	<i>mabA</i> : L203	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR306	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	35	πτύελα	2011	INH-L	ST42	unclassified	<i>mabA-inhA</i> : c-17t	<i>ndh</i> :S124, <i>srnR homolog</i> :K367
LAR354	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	APPEN	58	πτύελα	2012	INH-L	ST13	S	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR265	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	APPEN	24	πτύελα	2010	INH-L	ST13	S	Δεν ανιχνεύθηκαν	<i>rpoB</i> : I491F
LAR277	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	44	πτύελα	2010	INH-H	ST85	Haarlem	<i>katG</i> : S315T, <i>oxyR-ahpC</i> : g-48a	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR325	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	πτύελα	2012	INH-H	ST3	Beijing	<i>katG</i> : S315T	<i>embB</i> : M306I
LAR361	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	63	πτύελα	2013	INH-H	ST6	Haarlem	<i>katG</i> : D74N	<i>katG</i> : A162
LAR334	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	61	πτύελα	2012	INH-L/SM-L	ST13	S	Δεν ανιχνεύθηκαν / Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR253	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	72	πτύελα	2010	INH-H/SM-L	ST6	Haarlem	<i>katG</i> : W477stop, <i>oxyR-ahpC</i> : c-54t, <i>nat</i> : D171G/ <i>gidB</i> : c115del	<i>iniA</i> : V33G
LAR267	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	83	πτύελα	2010	INH-L/SM-H	ST23	Haarlem	<i>katG</i> : G691S, <i>mabA-inhA</i> : c-15t/ <i>gidB</i> : G73V	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR283	ΡΩΣΙΑ	ΘΗΛΥ	36	γαστρικό	2011	INH-L/SM-H	ST4	unclassified	<i>mabA-inhA</i> : c-15t/ <i>gidB</i> : H48Q	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR458	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	βρογχικές	2016	INH-L/SM-H	ST88	unclassified	<i>oxyR-ahpC</i> : A-85ins/ <i>gidB</i> : A138E	<i>nat</i> :A196, <i>panD</i> : S25
LAR266	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	APPEN	26	πτύελα	2010	SM-L	ST87	CAS/Delhi	Δεν ανιχνεύθηκαν	<i>gidB</i> : g102del, <i>iniA</i> : L589V, <i>oxyR-ahpC</i> :a-80g
LAR269	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	72	ούρα	2010	SM-L	ST23	Haarlem	<i>gidB</i> : A53D	<i>gidB</i> : S70
LAR270	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	75	πτύελα	2010	SM-L	ST13	S	Δεν ανιχνεύθηκαν	<i>gidB</i> : g102del
LAR232	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	53	πτύελα	2009	SM-H	ST26	unclassified	<i>gidB</i> : V65G, V177L	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR239	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	64	πτύελα	2010	SM-H	ST3	Beijing	<i>rpsL</i> :K43R	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR258	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	βρογχικές	2010	SM-H	ST81	Tur	<i>gidB</i> : T146R	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR268	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	50	πτύελα	2010	SM-H	ST89	X-type	<i>rpsL</i> :K43R	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR438	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	πτύελα	2015	SM-H	ST23	Haarlem	<i>gidB</i> : c61del	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR449	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	γαστρικό	2016	SM-H	ST4	unclassified	<i>gidB</i> : (tgtggagcgg)90-99del	<i>gidB</i> : R175
LAR408	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	87	βρογχικές	2014	SM-H/PZA	ST6	Haarlem	<i>gidB</i> : G42S / Δεν ανιχνεύθηκαν	Rv0340: E17
LAR474	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	53	πτύελα	2017	SM-H/PZA	ST3	Beijing	<i>rpsL</i> :K43R / <i>pncA</i> : L582W	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR364	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	ιστός	2013	EMB	ST92	LAM	Δεν ανιχνεύθηκαν	<i>efpA</i> : A10G / <i>gidB</i> : L16R
LAR403	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	78	πτύελα, ούρα	2014	EMB	ST89	X-type	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR466	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	81	λεμφαδένας	2017	EMB	ST26	unclassified	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR235	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	62	πτύελα	2009	RIF	ST77	unclassified	<i>rpoB</i> : S450L	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR337	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	53	πτύελα	2012	PZA	ST90	unclassified	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR454	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	87	πτύελα	2016	PZA	ST23	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR211	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	31	πτύελα	2009	Ευαίσθητο	ST13	S	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR227	ΓΕΩΡΓΙΑ	APPEN	41	πτύελα	2009	Ευαίσθητο	ST3	Beijing	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR241	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	58	πτύελα	2010	Ευαίσθητο	ST91	S	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR248	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	πόο	2010	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR251	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	70	βρογχικές	2010	Ευαίσθητο	ST13	S	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR254	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	γαστρικό	2010	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR271	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	ούρα	2010	Ευαίσθητο	ST86	unclassified	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR282	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	38	πτύελα	2011	Ευαίσθητο	ST4	unclassified	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR326	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	πλευριτικό	2012	Ευαίσθητο	ST3	Beijing	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR348	ΟΥΚΡΑΝΙΑ	ΘΗΛΥ	54	πτύελα	2012	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR371	ΠΑΛΑΙΣΤΙΝΗ	APPEN	21	πτύελα	2013	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR372	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	ΘΗΛΥ	20	πτύελα	2013	Ευαίσθητο	ST26	unclassified	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR404	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	APPEN	32	γαστρικό	2014	Ευαίσθητο	ST3	Beijing	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR412	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	70	βρογχικές	2015	Ευαίσθητο	ST23	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR442	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	APPEN	62	πτύελα	2016	Ευαίσθητο	ST26	unclassified	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR464	ΓΕΩΡΓΙΑ	APPEN	53	πτύελα	2017	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν
LAR465	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	34	FNA	2017	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	Δεν ανιχνεύθηκαν	Δεν ανιχνεύθηκαν

Πίνακας 3.4α: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταλλάξεων *M. tuberculosis*/*M. capnettii*

No TB	Χώρα καταγωγής	Φύλο	Ηλικία	Βιολογικό υλικό	Ημερομηνία απομόνωσης	Φαινότυπος	Προφίλ ST	MIRU-VNTR οικογένεια	Πολυμορφισμοί
LAR221	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	79	πτύελα	2009	INH-L	ST13	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR240	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	74	βρογχικές	2010	INH-L	ST88	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR255	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	APPEN	25	πτύελα	2010	INH-L	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR306	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	35	πτύελα	2011	INH-L	ST42	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR354	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	APPEN	58	πτύελα	2012	INH-L	ST13	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR265	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	APPEN	24	πτύελα	2010	INH-L	ST13	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR277	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	44	πτύελα	2010	INH-H	ST85	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR325	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	πτύελα	2012	INH-H	ST3	Beijing	katG: R463L, mshA: A187V, Rv1592c: E321 / I322V, accD6: D229G, gidB: E92D / A205, rpsA: R212
LAR361	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	63	πτύελα	2013	INH-H	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR334	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	61	πτύελα	2012	INH-L/SM-L	ST13	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR253	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	72	πτύελα	2010	INH-H/SM-L	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR267	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	83	πτύελα	2010	INH-L/SM-H	ST23	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR283	ΡΩΣΙΑ	ΘΗΛΥ	36	γαστρικό	2011	INH-L/SM-H	ST4	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR458	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	βρογχικές	2016	INH-L/SM-H	ST88	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR266	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	APPEN	26	πτύελα	2010	SM-L	ST87	CAS/Delhi	katG: R463L, oxyR-ahpC: g-88a, srm homolog: M323T, Rv1592c: E321 / I322V, gidB: A205, pncA: S65
LAR269	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	72	ούρα	2010	SM-L	ST23	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR270	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	75	πτύελα	2010	SM-L	ST13	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR232	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	53	πτύελα	2009	SM-H	ST26	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR239	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	64	πτύελα	2010	SM-H	ST3	Beijing	katG: R463L, mshA: A187V, Rv1592c: E321 / I322V, accD6: D229G, gidB: E92D / A205, rpsA: R212
LAR258	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	βρογχικές	2010	SM-H	ST81	Tur	mshA : L244
LAR268	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	50	πτύελα	2010	SM-H	ST89	X-type	Rv1592c: E321 / I322V
LAR438	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	πτύελα	2015	SM-H	ST23	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR449	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	γαστρικό	2016	SM-H	ST4	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR408	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	87	βρογχικές	2014	SM-H/PZA	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR474	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	53	πτύελα	2017	SM-H/PZA	ST3	Beijing	katG: R463L, mshA: A187V, Rv1592c: E321 / I322V, accD6: D229G, gidB: E92D / A205, rpsA: R212
LAR364	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	ιστός	2013	EMB	ST92	LAM	Rv0340 : I30, gidB : L16R
LAR403	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	78	πτύελα, ούρα	2014	EMB	ST89	X-type	Rv1592c: E321 / I322V
LAR466	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	81	λεμφαδένας	2017	EMB	ST26	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR235	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	62	πτύελα	2009	RIF	ST77	unclassified	Rv1592c: E321 / I322V
LAR337	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	53	πτύελα	2012	PZA	ST90	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR454	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	87	πτύελα	2016	PZA	ST23	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR211	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	31	πτύελα	2009	Ευαίσθητο	ST13	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR227	ΓΕΩΡΓΙΑ	APPEN	41	πτύελα	2009	Ευαίσθητο	ST3	Beijing	katG: R463L, mshA: A187V, Rv1592c: E321 / I322V, accD6: D229G, gidB: E92D / A205, rpsA: R212
LAR241	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	58	πτύελα	2010	Ευαίσθητο	ST91	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR248	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	πύο	2010	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR251	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	70	βρογχικές	2010	Ευαίσθητο	ST13	S	nat : G207R, ndh : V18A , iniA : G155
LAR254	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	83	γαστρικό	2010	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR271	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	77	ούρα	2010	Ευαίσθητο	ST86	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR282	ΑΛΒΑΝΙΑ	APPEN	38	πτύελα	2011	Ευαίσθητο	ST4	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR326	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	90	πλευριτικό	2012	Ευαίσθητο	ST3	Beijing	katG: R463L, mshA: A187V, Rv1592c: E321 / I322V, accD6: D229G, gidB: E92D / A205, rpsA: R212
LAR348	ΟΥΚΡΑΝΙΑ	ΘΗΛΥ	54	πτύελα	2012	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR371	ΠΑΛΑΙΣΤΙΝΗ	APPEN	21	πτύελα	2013	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR372	ΒΟΥΛΓΑΡΙΑ	ΘΗΛΥ	20	πτύελα	2013	Ευαίσθητο	ST26	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR404	ΠΑΚΙΣΤΑΝ	APPEN	32	γαστρικό	2014	Ευαίσθητο	ST3	Beijing	katG: R463L, mshA: A187V, Rv1592c: E321 / I322V, accD6: D229G, gidB: E92D / A205, rpsA: R212
LAR412	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	70	βρογχικές	2015	Ευαίσθητο	ST23	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR442	ΡΟΥΜΑΝΙΑ	APPEN	62	πτύελα	2016	Ευαίσθητο	ST26	unclassified	Δεν ανιχνεύτηκαν
LAR464	ΓΕΩΡΓΙΑ	APPEN	53	πτύελα	2017	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V
LAR465	ΕΛΛΑΔΑ	ΘΗΛΥ	34	FNA	2017	Ευαίσθητο	ST6	Haarlem	mshA: N111S, Rv1592c: E321 / I322V

Πίνακας 3.4.β: Συγκεντρωτικός πίνακας πολυμορφισμών *M. tuberculosis*/*M. Canettii*

3.5 Μοριακός έλεγχος γονιδίων αντοχής στα 1ης και 2ης γραμμής αντιφυματικά των στελεχών *M. bovis*

Τα στελέχη *M. bovis* (BCG και *M. bovis* spp *bovis*) ήταν ανθεκτικά μόνο στην πυραζιναμίδη. Σε όλα τα έξι PZA-R στελέχη βρέθηκαν η μετάλλαξη H57D (c169g:CAC→GAC) στο γονίδιο *pncA* και η μετάλλαξη A440T (g1320a:GCG→ACG) στο γονίδιο *rpsA*, ενώ δεν έφεραν καμία μεταλλαγή στο γονίδιο *panD* (Πίνακας 3.4γ).

Στα υπόλοιπα αντιφυματικά φάρμακα (INH, EMB, RIF, STR) ήταν ευαίσθητα. Ωστόσο, από τον μοριακό έλεγχο των γονιδίων αντοχής αυτών των αντιφυματικών φαρμάκων προέκυψαν υποκαταστάσεις σε αρκετούς γενετικούς τόπους.

Όσον αφορά τα υπό μελέτη γονίδια που σχετίζονται με αντοχή στην ισονιαζίδη, δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές στα γονίδια *inhA*, *ahpC*, *mabA*, *nat*, *mshA*, *iniB*, *iniC*, *Rv0340*, *ndh*, *aacD6*, *efpA*, *kasA*, *fbpC*, *fabD*, *Rv1772*, *fadE24* και στον υποκινητή του γονιδίου *inhA*. Στο γονίδιο *katG*, εντοπίστηκαν μια η συνώνυμη μετάλλαξη R463L και δυο συνώνυμες μεταλλάξεις, η P29 (c87a: CCC→CCA) και η T203 (c609t: ACC→ACT) σε όλα τα έξι στελέχη *M. bovis*. Ωστόσο, ένα μόνο στέλεχος (LAR469) έφερε δυο επιπλέον σιωπηλές υποκαταστάσεις, την T376 (g1128a: ACG→ACA) και την P347 (t1041g: CCT→CCG), στο γονίδιο *katG*. Η αλληλούχιση των υπολοίπων γονιδίων ανέδειξε σε όλα τα στελέχη *M. bovis* τις εξής μεταλλάξεις, την G285A στο γονίδιο *oxyR*, την N88S (a263g:AAT→AGT) στο *iniA* γονίδιο και τη διπλή E321 και I322V στο γονίδιο *Rv1592c*. Ενώ, στο γονίδιο *Rv0340* βρέθηκε η σιωπηλή μεταλλαγή G64 (c191t: GGC→GGT) μόνο στα δυο στελέχη *M. bovis* spp *bovis* και σε κανένα από τα στελέχη BCG. Ομοίως, όλα τα τέσσερα στελέχη BCG άλλα κανένα στέλεχος *M. bovis* spp *bovis* έφεραν τις μεταλλάξεις, A365T (g1093a:GCT→ACT) στο γονίδιο *srmR homolog* και A43V (c128t:GCC→GCT). στο γονίδιο *furA*. Τέλος στη διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* βρέθηκε η αντικατάσταση t-89g σε ένα μόνο στέλεχος (LAR469) (Πίνακας 3.4γ).

Σχετικά με το γονίδιο *embB*, το οποίο σχετίζεται με αντοχή στην αιθαμβουτόλη, ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη E378A (a1138t: GAG→GCG) σε όλα τα έξι στελέχη *M. bovis*. Στο γονίδιο *proB*, σχετιζόμενο με αντοχή στην ριφαμπικίνη, κανένα στέλεχος *M. bovis* δεν

έφερε υποκατάσταση. Τέλος, από την αλληλούχηση των γονιδίων *rpsL*, *rrs* και *gidB* ανευρέθηκε μόνο η σιωπηλή μετάλλαξη A205 (a615g:GCA→GCG) στο γονίδιο *gidB* σε όλα τα στελέχη *M. bovis* (Πίνακας 3.4γ).

No TB	Χώρα καταγωγής	Φύλο	Ηλικία	Βιολογικό υλικό	Ημερομηνία απομόνωσης	Φαινότυπος	MTBC (HAIN)	Μεταλλάξεις συσχετιζόμενες με αντοχή	Μεταλλάξεις που δεν οδήγησαν σε φαινοτυπική αντοχή	Πολυμορφισμοί
LAR252	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	76	ούρα	2010	PZA	<i>M.bovis</i> spp <i>bovis</i>	<i>rncA</i> : H57D, <i>rpsA</i> : A440T	Δεν ανιχνεύτηκαν	<i>katG</i> : R463L/ P29/T203, <i>oxyR</i> :G285A, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>Rv1592c</i> : E321 / I322V, <i>Rv0340</i> : G64
LAR311	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	86	ούρα	2011	PZA	<i>M.bovis</i> BCG	<i>rncA</i> : H57D, <i>rpsA</i> : A440T	Δεν ανιχνεύτηκαν	<i>katG</i> : R463L/ P29/T203, <i>oxyR</i> :G285A,, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>Rv1592c</i> : E321 / I322V, <i>furA</i> : A43V, <i>srmR</i> homolog : A363T
LAR340	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	45	ούρα	2012	PZA	<i>M.bovis</i> BCG	<i>rncA</i> : H57D, <i>rpsA</i> : A440T	Δεν ανιχνεύτηκαν	<i>katG</i> : R463L/ P29/T203, <i>oxyR</i> :G285A,, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>Rv1592c</i> : E321 / I322V, <i>furA</i> : A43V, <i>srmR</i> homolog : A363T
LAR350	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	77	ούρα	2012	PZA	<i>M.bovis</i> BCG	<i>rncA</i> : H57D, <i>rpsA</i> : A440T	Δεν ανιχνεύτηκαν	<i>katG</i> : R463L/ P29/T203, <i>oxyR</i> :G285A,, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>Rv1592c</i> : E321 / I322V, <i>furA</i> : A43V, <i>srmR</i> homolog : A363T
LAR399	ΕΛΛΑΔΑ	APPEN	82	ούρα	2014	PZA	<i>M.bovis</i> BCG	<i>rncA</i> : H57D, <i>rpsA</i> : A440T	Δεν ανιχνεύτηκαν	<i>katG</i> : R463L/ P29/T203, <i>oxyR</i> :G285A,, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>Rv1592c</i> : E321 / I322V, <i>furA</i> : A43V, <i>srmR</i> homolog : A363T
LAR469	ΙΡΑΚ	APPEN	22	λεμφαδένας	2017	PZA	<i>M.bovis</i> spp <i>bovis</i>	<i>rncA</i> : H57D, <i>rpsA</i> : A440T	<i>katG</i> : T376 / P347, <i>oxyR-ahpC</i> : t-89g	<i>katG</i> : R463L/ P29/T203, <i>oxyR</i> :G285A, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>Rv1592c</i> : E321 / I322V, <i>Rv0340</i> : G64

Πίνακας 3.4.γ: Συγκεντρικός πίνακας μεταλλάξεων και πολυμορφισμών *M. bovis*

3.6.1 Αποτελέσματα πολυμορφισμών σε σχέση με τους κλωνικούς τύπους STs

Η λεπτομερής μελέτη των μεταλλάξεων έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα πολυμορφισμών στους εκάστοτε κλωνικούς τύπους:

✚ ST3

katG γονίδιο: R463L, *mshA* γονίδιο: A187V, *Rv1592c* γονίδιο: E321/ I322V, *accD6* γονίδιο: D229G, *gidB* γονίδιο: E92D / A205, *rpsA* γονίδιο: R212

✚ ST6 και ST23

mshA γονίδιο: N111S, *Rv1592c* γονίδιο: E321 / I322V

✚ ST13 και ST91

nat γονίδιο: G207R, *ndh* γονίδιο: V18A, *iniA* γονίδιο: G155

✚ ST81

mshA γονίδιο: L244

✚ ST87

katG γονίδιο: R463L, *oxyR-ahpC* περιοχή: g-88a, *srm homolog* γονίδιο: M323T, *Rv1592c* γονίδιο: E321 / I322V, *gidB* γονίδιο: A205, *pncA* γονίδιο: S65

✚ ST92

Rv0340 γονίδιο: I30, *gidB* γονίδιο: L16R

✚ ST89 και ST77

Rv1592c γονίδιο: E321/ I322V

Ωστόσο, στους κλωνικούς τύπους ST4, ST26, ST42, ST86, ST88 και ST90 δεν ανευρέθηκαν φυλογενετικοί πολυμορφισμοί.

3.6.2 Αποτελέσματα πολυμορφισμών σε σχέση με τις οικογένειες MIRU-VNTR

Η λεπτομερής μελέτη των μεταλλάξεων έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα πολυμορφισμών στους διάφορους γονοτύπους MIRU-VNTR:

✚ Beijing

katG γονίδιο: R463L, *mshA* γονίδιο: A187V, *Rv1592c* γονίδιο: E321/ I322V, *accD6* γονίδιο: D229G, *gidB* γονίδιο: E92D/ A205, *rpsA* γονίδιο: R212

✚ Haarlem

mshA γονίδιο: N111S, *Rv1592c* γονίδιο: E321/ I322V

✚ S-type

nat γονίδιο: G207R, *ndh* γονίδιο: V18A, *iniA* γονίδιο: G155

✚ Tur

mshA γονίδιο: L244

✚ CAS/Delhi

katG γονίδιο: R463L, *oxyR-ahpC* περιοχή: g-88a, *srmR homolog* γονίδιο: M323T, *Rv1592c* γονίδιο: E321/ I322V, *gidB* γονίδιο: A205, *pncA* γονίδιο: S65

✚ LAM

Rv0340 γονίδιο: I30, *gidB* γονίδιο: L16R

✚ X-type

Rv1592c γονίδιο: E321/ I322V

3.6.3 Αποτελέσματα πολυμορφισμών των στελεχών *M. bovis*

✚ *M. bovis* (*M. bovis* spp *bovis* και BCG)

katG γονίδιο: R463L/ P29/ T203, *oxyR* γονίδιο: G285A, *Rv1592c* γονίδιο: E321/ I322V, *iniA* γονίδιο: N88S, *embB*: E378A, *gidB* γονίδιο: A205, *pncA* γονίδιο: H57D, *rpsA* γονίδιο: A440T

✚ *M. bovis* spp *bovis*

Rv0340 γονίδιο: G64

✚ BCG

srmR homolog γονίδιο: A363T, *furA* γονίδιο: A43V

Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά και συνδυαστικά οι πολυμορφισμοί με τα προφίλ ST και τις οικογένειες MIRU-VNTR, καθώς επίσης και οι πολυμορφισμοί των στελεχών *M. bovis* spp *bovis* και BCG.

MTBC	Προφίλ ST	MIRU-VNTR οικογένεια	Πολυμορφισμοί
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST3	Beijing	<i>katG</i> : R463L, <i>mshA</i> : A187V, <i>Rv1592c</i> : E321E/ I322V, <i>accD6</i> : D229G, <i>gidB</i> : E92D/ A205, <i>rpsA</i> : R212
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST6	Haarlem	<i>mshA</i> : N111S, <i>Rv1592c</i> : E321E/ I322V
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST23		
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST85		
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST13	S	<i>nat</i> : G207R, <i>ndh</i> : V18A, <i>iniA</i> : G155
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST91		
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST87	CAS/Delhi	<i>katG</i> : R463L, <i>oxyR-ahpC</i> : g-88a, <i>srm homolog</i> : M323T, <i>Rv1592c</i> : E321E/ I322V, <i>gidB</i> : A205, <i>pncA</i> : S65
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST92	LAM	<i>Rv0340</i> : I30, <i>gidB</i> : L16R
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST81	Tur	<i>mshA</i> : Leu244
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST89	X-type	<i>Rv1592c</i> : E321E/ I322V
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST77	unclassified	<i>Rv1592c</i> : E321E/ I322V
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST4	unclassified	
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST26	unclassified	
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST42	unclassified	
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST86	unclassified	
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST88	unclassified	
<i>M. tuberculosis/ M. canettii</i>	ST90	unclassified	
<i>M. bovis</i> BCG			<i>katG</i> : R463L/ P29/ T203, <i>oxyR</i> : G285A, <i>Rv1592c</i> : E321E/ I322V, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>srmR homolog</i> : A363T, <i>furA</i> : A43V
<i>M. bovis</i> spp <i>bovis</i>			<i>katG</i> : R463L/ P29/ T203, <i>oxyR</i> : G285A, <i>Rv1592c</i> : E321E/ I322V, <i>iniA</i> : N88S, <i>gidB</i> : A205, <i>embB</i> : E378A, <i>Rv0340</i> : G64

Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα πολυμορφισμών συνδυαστικά με τα προφίλ ST και προφίλ MIRU-VNTR, καθώς και των στελεχών *M. bovis*

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φυματίωση παραμένει ένα διαχρονικό πρόβλημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως. Η υψηλή θνησιμότητα της και νοσηρότητα της την κατατάσσουν στην πρώτη θέση των λοιμώξεων. Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η ανάδυση ανθεκτικών στελεχών, ειδικότερα των πολυανθεκτικών (MDR-TB) και εξαιρετικά ανθεκτικών (XDR-TB) στελεχών που οδηγούν σε ανεπάρκεια της θεραπείας και απειλούν να καταστήσουν τη νόσο ανίατη. Τα τελευταία χρόνια, ο έλεγχος της φυματίωσης αποτελεί παγκόσμια πρόκληση και γίνονται σημαντικές προσπάθειες για τον περιορισμό της.

Η εμφάνιση ανθεκτικών *M. tuberculosis* στελεχών έχει τεκμηριωθεί από τα πρώτα χρόνια της εισαγωγής της στρεπτομυκίνης του πρώτου φαρμάκου για τη θεραπεία της φυματίωσης, που συνδέθηκε με ανεπαρκή θεραπεία (Medical Research Council, 1948, 1952). Παρόλη την ανακάλυψη των υπολοίπων αντιφυματικών πρώτης γραμμής και τη χημειοθεραπευτική προσέγγιση πολλαπλών φαρμάκων για τη θεραπεία της νόσου, το πρόβλημα της εξάπλωσης των ανθεκτικών στελεχών επιδεινώθηκε (Keshavjee and Farmer PE, 2012). Η εμφάνιση κάθε νέου αντιφυματικού φαρμάκου οδηγούσε στην επιλογή μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή σε αυτό (Keshavjee and Farmer PE, 2012, Manten and Van Wijngaarden, 1969, Fox *et al.*, 1999). Η ανεπαρκής ή η ακατάλληλη θεραπεία και η ελλιπής συμμόρφωση σε αυτή μπορούν να οδηγήσουν σε σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων, συμβάλλουν στην ενίσχυση της αντοχής. Οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται σε γονίδια που κωδικοποιούν στόχους φαρμάκων ή μηχανισμούς μεταβολισμού φαρμάκων, επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητά τους κατά της φυματίωσης (Seifert M, Catanzaro *et al.*, 2015).

Εξέχουσας σημασίας είναι η άμεση εφαρμογή της αντιφυματικής θεραπείας για την επιτυχή έκβαση της πορείας του ασθενούς, τον περιορισμό της διασποράς του μικροοργανισμού στο περιβάλλον και την αποτροπή δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών. Ωστόσο, τροχοπέδη όλων αυτών αποτελεί ο βραδύς χρόνος πολλαπλασιασμού του μυκοβακτηριδίου (περίπου είκοσι ώρες), καθιστώντας την απομόνωση του και τον έλεγχο ευαισθησίας του στα αντιφυματικά εξαιρετικά χρονοβόρα. Η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών τόσο για την ταχεία ανίχνευση και ταυτοποίηση του στελέχους *M.*

tuberculosis απευθείας στο κλινικό δείγμα όσο και για τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στα πρώτης γραμμής αντιφυματικά αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο και αρωγό στην επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης.

Η μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση του *M. tuberculosis* βοήθησε στην κατανόησή της επιδημιολογία της φυματίωσης και συνέβαλε στον πληθυσμιακό έλεγχο της (Allix-Beguec *et al.*, 2008). Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει σχέση μολυσματικότητας και μεταδοτικότητας των διαφόρων *M. tuberculosis* γονοτύπων μεταξύ των ασθενών με φυματίωση (Hanekom *et al.*, 2007, de Jong *et al.*, 2008), επιτρέποντας τον εντοπισμό των εστιών, καθώς επίσης ότι η γεωγραφική προέλευση των στελεχών επηρεάζει τα ποσοστά μετάλλαξης και την πιθανότητα αντοχής στα αντιφυματικά (Ford *et al.*, 2013).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση του ποσοστού αντοχής και η διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στα διάφορα αντιφυματικά φάρμακα των στελεχών *M. tuberculosis* Complex, που απομονώθηκαν από ασθενείς στην περιοχή της Θεσσαλίας σε μια περίοδο εννέα ετών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μοριακή τυποποίηση αυτών περιλαμβάνοντας την MIRU-VNTR και την μέθοδο γονοτύπησης MST για πρώτη φορά εφαρμόστηκε στην Ελλάδα. Τέλος, διερευνήθηκε η ύπαρξη πολυμορφισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φυλογενετικοί δείκτες συνεισφέροντας σε επιδημιολογικές έρευνες.

Το ποσοστό αντοχής των στελεχών *M. tuberculosis* Complex που εμφάνισαν αντοχή στα πρώτης και δεύτερης γραμμής αντιφυματικά φάρμακα στην περιοχή μας προσδιορίστηκε στο 11,69%. Το ποσοστό είναι σύμφωνο με αναφορές της Βόρειας Ελλάδας και του Εθνικού Κέντρου αναφοράς της Φυματίωση στην Αθήνα (11%) (Anastasakos *et al.*, 2017, Papaventsis *et al.*, 2010, Manika *et al.*, 2019, Papakala *et al.*, 2017), καθώς επίσης και με τα τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του Π.Ο.Υ (2019), του ECDC (2020) και του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ (2015), αλλά είναι υψηλότερο συγκριτικά με τις περισσότερες χώρες της Δυτικής Ευρώπης (Kazdaglis *et al.*, 2016, Hargreaves *et al.*, 2017, ECDC, 2020). Η πλειοψηφία των στελεχών *M. tuberculosis* εμφάνισε αντοχή στην στρεπτομυκίνη (6%) με μικρή διαφορά από την ισονιαζίδη (5,2%) όπως υπολογίστηκε κι σε άλλες εργασίες της Ελλάδος (Anastasakos *et al.* 2017, Papaventsis *et al.* 2010, Gkaravela *et al.* 2017). Η συνολική έκθεση για την αντοχή των αντιφυματικών φαρμάκων του Π.Ο.Υ.

καθώς επίσης τα πιο πρόσφατα δημοσιευμένα δεδομένα του ECDC εκτιμούν ομοίως μια μικρή υπεροχή της στρεπτομυκίνης έναντι ισονιαζίδης. Ωστόσο, σε κάποια κράτη της Ευρώπης (π.χ. Ρουμανία, Βουλγαρία) και της υπόλοιπης υφηλίου (π.χ. Ρωσία) παρατηρούνται περισσότερα ανθεκτικά στελέχη στην ισονιαζίδη παρά στην στρεπτομυκίνη (Anastasakos *et al.* 2017, Papaventsis *et al.*, 2010, Gkaravela *et al.* 2017, WHO, 2008, ECDC, 2014). Το εν λόγω γεγονός ερμηνεύει το υψηλό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών στην ισονιαζίδη στους αλλοδαπούς (8,6%) σε σχέση με τους Έλληνες (4,5%) αυτής της εργασίας. Μια διαφορά της παρούσας εργασίας από τις υπόλοιπες μελέτες στο Ελλαδικό χώρο είναι η απουσία MDR-TB στελεχών (Neonakis *et al.*, 2007, Papaventsis *et al.*, 2010, Kazdaglis *et al.*, 2016, Anastasakos *et al.* 2017, Gkaravela *et al.* 2017 Manika *et al.*, 2019). Παρότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η μονοαντοχή στην ριφαμπικίνη είναι σπάνια και πάνω από το 90% όλων των RIF-R κλινικών στελεχών παρουσιάζουν ταυτόχρονα αντοχή στην ισονιαζίδη (Yam *et al.*, 2004, Siu *et al.*, 2011), στην μελέτη μας δεν βρέθηκαν τέτοια στελέχη. Αντίθετα, πολύ μικρό ποσοστό στελεχών με αντοχή αποκλειστικά στη ριφαμπικίνη ανιχνεύθηκε.

Η συχνότητα ανεύρεσης του μικροοργανισμού στους Έλληνες (70,3%) και στους αλλοδαπούς (82,4%) ήταν μεγαλύτερη στο αντρικό φύλο και συνάδει με τα τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του Π.Ο.Υ (2019), του ECDC (2020) και του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ (2015). Οι λόγοι της εμφάνισης υψηλότερων ποσοστών στους άντρες δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι (Ottmani and Uplekar, 2008). Πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν τις βιολογικές διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών σε ορισμένες ηλικιακές ομάδες που επηρεάζουν τον κίνδυνο μόλυνσης, καθώς και τον κίνδυνο πρόκλησης λοίμωξης στην ενεργό νόσο (Thorson *et al.*, 2007).

Όσον αφορά την ηλικιακή κατανομή της νόσου, οι περισσότεροι Έλληνες ασθενείς ήταν άνω των 60 ετών (78,4%), ενώ οι αλλοδαποί ασθενείς κυμαινόταν μεταξύ 20 με 41 ετών (70,6%). Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με τα δηλωθέντα κρούσματα για την Ελλάδα στον ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ(2015) και στο ECDC (2020). Η ηλικιακή διαφορά μεταξύ ιθαγενών και αλλοδαπών πιθανώς έγκειται στο γεγονός ότι οι αλλοδαποί ήταν άτομα προερχόμενα από χώρες με υψηλό επιπολασμό της φυματίωσης, με περιορισμένη υγειονομική περίθαλψη και από χώρους συνωστισμού διαβίωσης (φυλακές, κατακλυσμός

προσφύγων). Αντιθέτως, οι ηλικιωμένοι Έλληνες αποτελούν ευπαθή ομάδα λόγω του εξασθενημένου ανοσοποιητικού συστήματος.

Για πρώτη φορά στην Ελλάδα και δεύτερη φορά σε παγκόσμιο επίπεδο εφαρμόστηκε η μέθοδος γονοτύπησης MST. Η μελέτη ανέδειξε 8 νέους κλώνους (ST85, ST86, ST87, ST88, ST89, ST90, ST91, ST92). Επικρατέστεροι ήταν οι κλώνοι ST6 (20,8%) και ακολουθούν με ποσοστό 14,6% και 12,5%, οι κλώνοι ST13 και ST3, αντίστοιχα. Στην εργασία των Djelouadji *et al.* (2009) κυρίαρχοι κλώνοι ήταν οι ST8 και ST19, οι οποίοι δεν κυκλοφορούν στην περιοχή μας. Από την σύγκριση των υπολοίπων κλώνων της Κεντρικής Ελλάδας και Νότιας Γαλλίας προέκυψε ότι οι μόνοι κοινοί κλώνοι που βρέθηκαν ήταν οι ST6 (20,8% έναντι 7,7%), ST3 (12,5% έναντι 7,7%), ST23 (10,4% έναντι 9,6%), ST4 (6,3% έναντι 3,8%), οι οποίοι παρουσιάζουν σημαντική ποσοστιαία απόκλιση. Εξέχουσας σημασίας είναι η παρατήρηση ότι οι ίδιοι κλωνικοί τύποι συμπεριλαμβανομένου και του ST26 μοιράζονται στους αλλοδαπούς αλλά και στους Έλληνες της Θεσσαλίας. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι πρόκειται για τους πιο λοιμογόνους STs με παγκόσμια διασπορά. Απαιτούνται ωστόσο αρκετές επιπρόσθετες επιδημιολογικές μελέτες για την τεκμηρίωση αυτής της υπόθεσης. Όλοι τα νέα προφίλ ST εκτός από τον ST87 απομονώθηκαν από Έλληνες ασθενείς και προφανώς σχετίζονται με την επιδημιολογία της περιοχής. Επίσης, τα περισσότερα στελέχη και των δυο εργασιών ανήκουν στην γενεαλογική γραμμή Euro-American (lineage 4), αντιστοιχώντας τα προφίλ ST στις φυλογεωγραφικές γραμμές (phylogeographical lineages) (Djelouadji *et al.*, 2008).

Βάση της ανάλυση MIRU-VNTR, οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι γονότυποι ήταν οι Haarlem (33,3%), S-type (16,7%) και Beijing (12,5%). Τα υπόλοιπα στελέχη κατανέμονται στις οικογένειες X-type (4,2%), σε ποσοστό 2,1% το καθένα στις CAS/Delhi, LAM, Tur και 27% «αταξινόμητα» στελέχη. Τα αποτελέσματα φυλογενετικών αναλύσεων τριών άλλων περιοχών της Ελλάδας είναι επίσης δημοσιευμένα. Η παλιότερη εργασία του Εθνικού Κέντρου αναφοράς της Φυματίωση στην Αθήνα αναφέρει ότι τα πιο συχνά απομονωμένα στελέχη ανήκαν στις οικογένειες Beijing (34%) και Haarlem (24,5%) (Rovina *et al.*, 2011). Η δεύτερη εργασία που πραγματοποιήθηκε στην Βόρεια Ελλάδα ταυτοποίησε σε μεγαλύτερο ποσοστό μέλη των οικογενειών Haarlem (27%), T (24,3%) και Beijing (13,5%) (Kazdaglis *et al.*, 2018). Η τρίτη εργασία, μια πολυκεντρική, παρατήρησε ότι οι κυρίαρχες

οικογένειες ήταν οι Haarlem (12.0%), LAM (5.1%) και S-type (4,3%) (Gkaravela *et al.*, 2019). Συγκεντρωτικά, οι επικρατέστερες φυλογενετικές οικογένειες στην Ελλάδα φαίνεται ότι είναι οι Haarlem και Beijing. Όσον αφορά την κατανομή των υπολοίπων φυλογενετικών οικογενειών παρατηρείται διαφορά στις εκάστοτε γεωγραφικές περιοχές της χώρας μας. Στην παρούσα μελέτη αυξημένο ποσοστό στελεχών ανήκουν στην οικογένεια S, ενώ στις άλλες περιοχές κυμαίνεται σε χαμηλό ποσοστό, 0-5% των στελεχών. Επιπλέον, στην μελέτη της Αθήνας τυποποιήθηκαν οι οικογένειες Uganda, Ural και Cameroon, που απουσίαζαν από τις υπόλοιπες έρευνες. Σε αντίθεση έρχεται η παλιότερη εργασία του Εθνικού Κέντρου αναφοράς της Φυματίωση στην Αθήνα εξαιτίας του χαμηλού ποσοστού στελεχών (3,8%) που δεν ανήκαν σε κάποια οικογένεια, «αταξινόμητα». Σχετικά με την καταγωγή των ασθενών, στους Έλληνες και στους αλλοδαπούς επικρατεί ο γονότυπος Haarlem. Στους αλλοδαπούς βέβαια υπάρχει μικρή απόκλιση του Haarlem από τους Beijing και S-type σε αντίθεση με αυτά των Ελλήνων όπου το ένα τρίτο περίπου των στελεχών ανήκει στον Haarlem. Ο γονότυπος CAS/ Delhi ταυτοποιήθηκε μόνο σε έναν ασθενή από το Πακιστάν, ενώ οι LAM και Tur μόνο σε γηγενείς Έλληνες. Τα αποτελέσματα συνάδουν με τα διεθνή δεδομένα κατανομής των διάφορων οικογενειών. Οι δύο πιο διαδεδομένες οικογένειες σε ολόκληρο τον κόσμο και οι πιο μολυσματικές είναι οι Haarlem και Beijing. Ο Haarlem είναι ο κυρίαρχος γονότυπος στην Ευρώπη και την Αμερική, αλλά ο Beijing συναντάται πιο συχνά στην Ασία, την Ωκεανία, την Αφρική και τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης (Demay *et al.*, 2012, Brudey *et al.*, 2006). Ειδικότερα, ο Beijing έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με υποτροπή, αποτυχία θεραπείας, υψηλή λοιμογόνο δράση, ανθεκτικά και πολυανθεκτικά στελέχη στις περισσότερες χώρες του κόσμου. Επίσης, η οικογένεια S, η δεύτερη σε συχνότητα στην παρούσα μελέτη, εμφανίζεται πιο διαδεδομένη στη Νότια Ευρώπη και την Αφρική (Demay *et al.*, 2012, Brudey *et al.*, 2006).

Η μέθοδος αναφοράς MIRU-VNTR και η εναλλακτική μέθοδος γονοτύπησης MST συγκρίθηκαν διεξοδικά. Οι Djelouadji *et al.* (2008) χρησιμοποίησαν την μέθοδο MIRU-VNTR αλλά ως βοηθητική της μεθόδου IS6110-RFLP, η οποία ουσιαστικά συγκρίθηκε με την MST. Τα 48 στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε 12 διαφορετικούς ST και 8 MIRU-VNTR οικογένειες. Ως απόρροια της σύγκρισης των δυο μεθόδων ήταν η εκχώρηση του κλωνικού

τύπου και συγκεκριμένα του νέου προφίλ ST87 για πρώτη φορά στην φυλογεωγραφική γραμμή East-African-Indian (lineage 3). Επιπλέον, τα νέα κλωνικά προφίλ ST85, ST86, ST88, ST89, ST90, ST91 και ST92 καταχωρήθηκαν στην φυλογεωγραφική γραμμή Euro-American (lineage 4). Η μέθοδος MST απαιτεί λιγότερη ποσότητα γενετικού υλικού για την εκτέλεση της, έχει χαμηλή πιθανότητα επιμόλυνσης και είναι λιγότερο επίπονη από τη μέθοδο MIRU-VNTR. Από την άλλη πλευρά η μέθοδος MIRU-VNTR είναι μέθοδος αναφοράς με υψηλή διακριτική δύναμη. Είναι φανερό ότι ο συνδυασμός των δυο τεχνικών μπορεί να επιτυγχάνει καλύτερο επίπεδο διάκρισης και να αυξήσει την πιθανότητα να συσχετιστούν επιδημιολογικά τα ομαδοποιημένα στελέχη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα στελέχη κατανέμονται σε δυο φυλογεωγραφικές γραμμές, με το υψηλότερο ποσοστό 85,4% να ανήκει στη Euro-American (lineage 4) και ακολουθώντας η East-Asian (lineage 2) με ποσοστό 12,5%. Αυτές οι δύο γενεές (lineage) είναι οι διαδεδομένες παγκοσμίως (Borrell *and* Gagneux 2011, Coscolla *and* Gagneux 2014) και συχνά έχουν συσχετιστεί με αντοχή στα φάρμακα (Fenner *et al.*, 2012, Casali *et al.*, 2014, Cohen *et al.*, 2015, Merker *et al.*, 2015). Οι Gygli *et al.* (2017) ανέπτυξαν πρόσφατα τη θεωρία συσχέτισης των γενεολογικών γραμμών 2 και 4 με συχνή εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στα αντιφυματικά εξαιτίας του χαμηλού γενετικού κόστους. Ωστόσο, οι γενεαλογίες 2 και 4 είναι οι πιο διαδεδομένες και μπορεί η συσχέτιση τους με την αντοχή να οφείλεται στην μόλυνση μεγάλου αριθμού ασθενών από στελέχη που ανήκουν σε αυτές τις γενεές (lineage). Για την επιβεβαίωση ή όχι της υπόθεσης οι ίδιοι συγγραφείς (Gygli *et al.*, 2017) πρότειναν ενδελεχή μελέτη μεγάλου αριθμού ευαίσθητων και ανθεκτικών *M. tuberculosis* στελεχών των διάφορων γενεολογικών γραμμών στην πάροδο του χρόνου. Ένα άλλο σημαντικό εύρημα είναι ότι δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των κλωνικών τύπων και της αντοχής τους στα διάφορα αντιφυματικά φάρμακα. Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν αυτή την παρατήρηση (Gallego *et al.*, 2010, Pang *et al.*, 2012, Luiz Rdos *et al.*, 2013, Monteserin *et al.*, 2013, Yuan *et al.*, 2015).

Στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο του Νοσοκομείου μας, εφαρμόζεται ως αρχική προσέγγιση προσδιορισμού αντοχής ο χαρακτηρισμός μεταλλάξεων με τη χρήση του εμπορικού kit GenoType MTBDRplus Ver 2.0 (HAIN LifeScience) το οποίο έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει τις πιο κοινές μεταλλάξεις *kat315*, *inhA-15* (που σχετίζονται με

αντοχή στην ισονιαζίδη), και την *groB450* (στη ριφαμπικίνη), και του οποίου η ακρίβεια έχει ελεγχθεί εκτενώς (Ling *et al.*, 2008). Δεδομένης της συνολικής σχετικά παγκόσμιας υψηλής συχνότητας ανίχνευσής τους και ότι αυτές εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε στελέχη ανθεκτικά στην ισονιαζίδη (υψηλή εξειδίκευση), αυτές οι μεταλλάξεις θεωρούνται γενικά αξιόπιστοι δείκτες της αντοχής στην INH. Στην παρούσα μελέτη, οι μεταλλάξεις αυτές ανιχνεύθηκαν σε ένα μικρό ποσοστό των δικών μας στελεχών (28,6%) που εκφράζουν αντοχή σε ισονιαζίδη. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι άλλες λιγότερο συχνές ή νέες μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για την έκφραση αντοχής και ότι η εφαρμογή της εμπορικής μεθόδου αποδεικνύουν την ανάγκη για βελτίωση της συγκεκριμένης μεθόδου, με την προσθήκη επιπλέον μεταλλαγών του γονιδίου *katG*, του γονιδίου *inhA* άλλα και των υποκινητών των γονιδίων *inhA* και *ahpC* ή αντικατάσταση της από άλλες μεθόδους. Σε παρόμοια συμπεράσματα έχουν καταλήξει και παλιότερες έρευνες (Sethi *et al.*, 2017, Tadesse *et al.*, 2016).

Η αντοχή στην ισονιαζίδη των δεκατεσσάρων φαινοτυπικά ανθεκτικών στελεχών *M. tuberculosis/ M. canettii* ήταν υψηλού επιπέδου για τέσσερα και χαμηλού επιπέδου για δέκα εξ αυτών. Σε όλα τα στελέχη στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη καθώς και σε δυο με χαμηλού επιπέδου αντοχή παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG*. Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* υπερισχύουν σε στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη (Jagielski *et al.*, 2014, Jagielski *et al.*, 2015, Cardoso *et al.*, 2004, Kelley *et al.*, 1997). Σε παγκόσμιο επίπεδο, η αντοχή στην ισονιαζίδη συχνότερα συσχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG*. Συγκεκριμένα, σε υψηλότερη συχνότητα (64,2%) παρατηρούνται οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 315 του γονιδίου *katG*, με την υποκατάσταση S315T να κυριαρχεί, ενώ οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* εκτός από 315 εμφανίστηκαν με συχνότητα ανίχνευσης <1% (Seifert *et al.*, 2015). Η κατανομή της *katG315* διαφέρει σημαντικά ανά γεωγραφική περιοχή με τις συχνότητες να κυμαίνονται από 42% έως 95%. Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός των ανθεκτικών στην ισονιαζίδη στελεχών ήταν εξαιρετικά υψηλότερος σε Νότιο Αφρική (97,5%) (Kiepiela *et al.*, 2000), Ρωσία (93,6%) (Mokrousov *et al.*, 2002), σε Λιθουανία (85,7%)(Bakonyte *et al.*, 2003), Πολωνία (82%) (Jagielski *et al.*, 2015), Ρουμανία (80%) (Rosales-Klitz *et al.*, 2012), υψηλός σε Ουγκάντα (76%) (Kigozi *et al.*, 2018), Πολωνία (72%) (Jagielski *et al.*, 2014),

Αυστραλία (65,4%) (Lavender *et al.*, 2005), Νεπάλ (62,2%) (Marahatta *et al.*, 2012), Κίνα (64,4%) (Zhang *et al.*, 2005), Βραζιλία (61,9%) (Cardoso *et al.*, 2004), Ονδούρα (60%)(Rosales-Klantz *et al.*, 2012) και Κάτω Χώρες (53%) (van Soolingen *et al.*, 2000), άλλα χαμηλότερος σε Ιαπωνία (41%) (Abe *et al.*, 2008), Ιράν (40%) (Rosales-Klantz *et al.*, 2012), Ιταλία (37,8%)(Rindi *et al.*, 2005) και Η.Π.Α. (31%)(Guo *et al.*, 2006). Στην τρέχουσα μελέτη, η συγκεκριμένη μετάλλαξη βρέθηκε μόνο σε δυο στελέχη. Ο χαμηλός επιπολασμός (14,3%) της μετάλλαξης S315T μεταξύ των *M. tuberculosis*/*M. canettii* στελεχών με αντοχή στην ισονιαζίδη μπορεί να εξηγηθεί από τη απουσία MDR-TB στελεχών. Στην βιβλιογραφία, οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 315 του γονιδίου *katG* έχουν συσχετιστεί κυρίως με στελέχη που έχουν υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη και είναι επί το πλείστον MDR-TB στελέχη (Cardoso *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2005, van Soolingen *et al.*, 2000, Luo *et al.*, 2010). Μια επιπλέον σημαντική παρατήρηση είναι ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων *katG315* είναι σημαντικά υψηλότερη σε MDR στελέχη από ότι σε στελέχη με αντοχή μόνο στην ισονιαζίδη (Bakonyte *et al.*, 2003, Herrera *et al.*, 2004, Boonaiam *et al.*, 2010, Luo *et al.*, 2010, Jagielski *et al.*, 2015). Η υπεροχή των υποκαταστάσεων *katG315* και η ισχυρή τους συσχέτιση με τον φαινότυπο MDR, εξηγείται από το χαμηλό γενετικό κόστος αυτών των μεταλλάξεων και από το πλεονέκτημα επιβίωσης που προσδίδουν στα INH-R στελέχη. Στα υπόλοιπα δυο με υψηλού επιπέδου INH-R στελέχη, ανευρέθησαν η γνωστή μετάλλαξη W477stop (Sun *et al.*, 2008) και η νέα υποκατάσταση D74N στο γονίδιο *katG*. Στα δυο στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη που βρέθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* συνυπήρχαν αλλαγές στις περιοχές (δομική, υποκινητή) του γονιδίου *inhA*. Το μεν ένα στέλεχος έφερε γνωστές μεταλλάξεις τη σιωπηλή υποκατάσταση E399 στο γονίδιο *katG* και την S94A στο γονίδιο *inhA* (Hazbon *et al.*, 2006, Silva *et al.*, 2003). Η υποκατάσταση E399 στο γονίδιο *katG* έχει αναφερθεί από τους Jagielsk *et al.* σε στελέχη με χαμηλού επιπέδου μονοαντοχή στην ισονιαζίδη και χωρίς την παρουσία μετάλλαξης σε άλλα γονίδια (Jagielski *et al.*, 2015). Το δε άλλο στέλεχος έφερε τη νέα υποκατάσταση G691S στο γονίδιο *katG* και τη μετάλλαξη c-15t στον προαγωγέα του γονιδίου *inhA*. Ο συνδυασμός μεταλλάξεων στο γονίδιο *katG* και στην περιοχή *mabA-inhA* σε INH-R στελέχη έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μελέτες προηγουμένως (Jnawali *et al.*, 2013, Cardoso *et al.*, 2004, Isakova *et al.*, 2018, Dalla *et al.*, 2009). Σε δυο επιπλέον στελέχη με χαμηλού επιπέδου

αντοχή στην ισονιαζίδη βρέθηκε στο καθένα η c-15t και η c-17t στην περιοχή *mabA-inhA*. Η παρουσία μεταλλάξεων μόνο σε χαμηλού επιπέδου INH-R στελέχη συνάδει με παλιότερα ευρήματα του προαγωγέα του γονιδίου *inhA* (Guo *et al.*, 2006, Ramaswamy *et al.*, 2003) και της δομικής περιοχής αυτού (Kim *et al.*, 2003, Ramaswamy *et al.*, 2003, Vijdea *et al.*, 2008, Guo *et al.*, 2006). Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας υποστηρίζουν προηγούμενα ευρήματα σχετικά με το ποσοστό των μεταλλάξεων, 7,14% στο δομικό γονίδιο *inhA* και 21,4% στον προαγωγέα *inhA* (πιο ειδικά, ποσοστά 14,3% και 7,14%, οι υποκαταστάσεις c-15t και c-17t, αντίστοιχα) (Zhang *et al.*, 2005). Τόσο τα συγκεκριμένα αποτελέσματα όσο και αυτά άλλων μελετών επιβεβαιώνουν το ρόλο του γονιδίου *inhA* (ρυθμιστική και δομική περιοχή) στην αντοχή στην INH (Rozwarski *et al.*, 1998) αφού δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις σε ευαίσθητα στελέχη. Η υποκατάσταση c-15t του *inhA* προαγωγού αναφέρεται ως ο δεύτερος πιο συχνός μηχανισμός που οδηγεί σε αντοχή στην ισονιαζίδη και με τη παγκόσμια συχνότητα να κυμαίνεται μεταξύ 6% με 43% (Seifert *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2003, Kiepiela *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 1999, Telenti *et al.*, 1997, Brossier *et al.*, 2011, Perdigão *et al.*, 2008, Herrera *et al.*, 2004, Kiepiela *et al.*, 2000, Rattan *et al.*, 1998, Rossetti *et al.*, 2002, Ahmad *et al.*, 2009, Sreevatsan *et al.*, 1997). Συγκεντρωτικά, οι Seifert *et al.* (2015) ακολουθώντας το διαχωρισμό σε περιοχές βάση του Π.Ο.Υ (WHO regions), αποκάλυψαν διαφορές στην γεωγραφική κατανομή για την μετάλλαξη c-15t του γονιδίου *inhA*, όπως προαναφέρθηκε και για την *katG315*, με την περιοχή της Αμερικής να παρουσιάζει την υψηλότερη συχνότητα (24,6%) και την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου να αναφέρει τη χαμηλότερη συχνότητα (13,0%) (Seifert *et al.*, 2015).

Αξιοσημείωτη ήταν η παρουσία της σιωπηλής μετάλλαξης L203 (g609a) στο γονίδιο *mabA* που παρατηρήθηκε σε δύο χαμηλού επιπέδου INH-R στελέχη. Πρώτοι οι Ramaswamy *et al.* (2003) συσχέτισαν αυτή την υποκατάσταση με αντοχή στην ισονιαζίδη (Ramaswamy *et al.*, 2003). Το 2014, οι Ando *et al.* περιέγραψαν το ρόλο αυτής της μετάλλαξης, αποδεικνύοντας ότι αυτή συμβάλλει στην μετατροπή ενός τμήματος του γονιδίου *fabG1* σε έναν εναλλακτικό υποκινητή για το γονίδιο *inhA* και ως εκ τούτου αυξάνει το επίπεδο έκφρασης του και κατά συνέπεια την αντοχή στην ισονιαζίδη (Ando *et al.*, 2014). Αυτός ο νέος εναλλακτικός μηχανισμός αντοχής, καλύπτει ένα τμήμα της αντοχής της ισονιαζίδης που λείπει από το *M. tuberculosis*, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι

σημαντικές για τη μοριακή διάγνωση στο μέλλον. Αργότερα, οι Torres *et al.* (2015) παρατήρησαν ότι ο συνδυασμός μεταλλάξεων του *mabA* (L203) και του γονιδίου *katG* οδηγεί σε υψηλού επιπέδου αντοχή, όπως έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει για το συνδυασμό των γονιδίων *inhA* και *katG* (Guo *et al.*, 2006, Piatek *et al.*, 2000).

Στην ενδογενή περιοχή *oxyR-ahpC* προσδιορίστηκαν μεταλλάξεις σε τρία (21,4%) INH-R στελέχη. Η συχνότητα των μεταλλάξεων στην *oxyR-ahpC* περιοχή σε σύγκριση με άλλους πληθυσμούς που κυμαίνονταν από 4,8% έως 29%, τοποθετείται μεταξύ των υψηλών ποσοστών (Cardoso *et al.*, 2004, Kelley *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 2001, Jagielski *et al.*, 2014, Sreevatsan *et al.*, 1997. Σε αρκετές μελέτες τα στελέχη με μετάλλαξη στον προαγωγέα του γονιδίου *ahpC* φέρουν επιπλέον μεταλλάξεις στο γονίδιο *katG* και τείνουν να έχουν υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη (Dalla *et al.*, 2009, Cardoso *et al.*, 2004, Jagielski *et al.*, 2014, Jnawali *et al.*, 2013, Seifert *et al.*, 2015). Αυτό συμβαδίζει με την υπόθεση ότι αρκετές από τις υποκαταστάσεις στη διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της πρωτεΐνης AhpC και με αυτό τον τρόπο αντισταθμίζουν τη δραστηριότητα της καταλάσης-υπεροξειδάσης (Kelley *et al.*, 1997, Ramaswamy *et al.*, 2003, Clemente *et al.*, 2008, Sreevatsan *et al.*, 1997, Rattan *et al.*, 1998). Στην παρούσα μελέτη, δύο από τα τρία στελέχη, παρουσίασαν τις μεταλλάξεις g-48a και c-54t το καθένα, οι οποίες έχουν προηγουμένως συνδεθεί με αντοχή σε INH στελεχών *M. tuberculosis* και έφεραν ταυτόχρονα υποκαταστάσεις στο γονίδιο *katG*, συνοδευόμενες με υψηλού επιπέδου αντοχή στην ισονιαζίδη (Cardoso *et al.*, 2004, Sreevatsan *et al.*, 1997, Dalla *et al.*, 2009, Jagielski *et al.*, 2015). Το τρίτο στέλεχος με χαμηλού επιπέδου αντοχή φιλοξενούσε μια μετάλλαξη μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης, συγκεκριμένα την ένθεση A-ins85. Σε αυτή τη θέση δεν έχει περιγραφεί προηγουμένως υποκατάσταση. Η απουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *katG* ή στον προαγωγέα του γονιδίου *inhA* στο συγκεκριμένο στέλεχος ενισχύουν την πιθανότητα σύνδεσης της ένθεσης A-ins85 με την αντοχή. Εντούτοις, ο ρόλος της μετάλλαξης A-ins85 και απουσία οποιασδήποτε δομικής αλλαγής του γονιδίου *katG* σε αυτό το στέλεχος είναι ενδιαφέρον και αξίζει περαιτέρω διερεύνηση. Σχετικά με το γονίδιο *katG*, η μετάλλαξη D171G συνυπάρχει με τις αλλαγές c-54t στο γονίδιο *oxyR-ahpC* και W477stop στο γονίδιο *katG*, δεν είχε αναφερθεί σε άλλες εργασίες και χρήζει περαιτέρω έρευνα για την συμβολή της στην αντοχή του στελέχους

στην INH. Ο ρόλος της στην ανάπτυξη αντοχής δεν ήταν δυνατόν να αποδειχθεί με σαφήνεια, αφού η επίδραση αυτής της μετάλλαξης πιθανώς καλύπτεται από τις άλλες δύο συνυπάρχουσες μεταλλάξεις, οι οποίες είναι γνωστό ότι προσδίδουν αντοχή στην ισονιαζίδη.

Η μεταλλαγή G207R στο γονίδιο *nat* εμφανίστηκε τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη της οικογένειας S-type και των κλωνικών τύπων ST13 και ST91. Ο συγκεκριμένος συσχετισμός πολυμορφισμού-κλωνικού τύπου (ST) και φυλογενετικής οικογένειας δεν έχει αναφερθεί σε παλιότερες μελέτες. Παρόμοιοι πολυμορφισμοί παρατηρήθηκαν στα γονίδια *katG*, *Rv1592c*, *mshA5*, *ndh*, *Rv1592*, *accD6*, *iniA*, *Rv0340*, *srmR homolog* και στον υποκινητή του *inhA* των ευαίσθητων και των ανθεκτικών στην ισονιαζίδη *M. tuberculosis*/*M. canettii* στελεχών. Για πρώτη φορά, συσχετίστηκαν πολυμορφισμοί με κλωνικούς τύπους. Προηγούμενες έρευνες έχουν οδηγηθεί στα ίδια συμπεράσματα σχετικά με τους πολυμορφισμούς που φέρουν συγκεκριμένες φυλογενετικές οικογένειες, με εξαίρεση αυτούς των γονιδίων *Rv1592c* και *iniA* που δεν έχουν σχολιαστεί από άλλους. Στην οικογένεια S-type και στους κλωνικούς τύπους ST13 και ST91 βρέθηκαν οι αλλαγές G155 στο γονίδιο *iniA* και V18A στο γονίδιο *ndh* (Coll *et al.*, 2014). Στην οικογένεια Beijing και το προφίλ ST3 ανευρέθησαν οι αλλαγές R463L στο γονίδιο *katG* (Feuerriegel *et al.*, 2014), A187V στο γονίδιο *mshA* (Feuerriegel *et al.*, 2014), D229G στο γονίδιο *accD6* (Regmi *et al.*, 2015) και E321 / I322V στο γονίδιο *Rv1592c*. Στην οικογένεια Haarlem και τους κλωνικούς τύπου ST6, ST23 και ST85 βρέθηκαν οι αλλαγές N111S στο γονίδιο *mshA* (Feuerriegel *et al.*, 2014) και E321 / I322V στο γονίδιο *Rv1592c*, ενώ στην οικογένεια Tur και τον ST81 η σιωπηλή υποκατάσταση L244 στο γονίδιο *mshA* (Feuerriegel *et al.*, 2014). Όσον αφορά τις οικογένειες CAS και LAM τα στελέχη που ανήκαν σε αυτές ήταν ευαίσθητα, ωστόσο οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν έχουν επιβεβαιωθεί ως δείκτες αυτών σε άλλες μελέτες. Το στέλεχος της οικογένεια CAS και προφίλ ST87 είχε τις μεταλλάξεις R463L στο γονίδιο *katG* (Feuerriegel *et al.*, 2014), E321 / I322V στο γονίδιο *Rv1592c*, M323T στο γονίδιο *srm homolog* (Ali A *et al.*, 2015) και g-88a στην *oxyR-ahpC* περιοχή (Feuerriegel *et al.*, 2014). Στην οικογένειας LAM και ST92 ανιχνεύτηκε η σιωπηλή μετάλλαξη I30 στο γονίδιο *Rv0340* (Saelens *et al.*, 2018, Ioerger *et al.*, 2009, Ilina *et al.*, 2013), η οποία σχέση χρήζει επιπρόσθετες έρευνες. Σε αυτό το σημείο

να αναφερθεί ότι πολυμορφισμοί βρέθηκαν και σε όλα τα έξι *M. bovis* ευαίσθητα στην ισονιαζίδη στελέχη. Πρόκειται για γνωστούς πολυμορφισμούς, R463L στο γονίδιο *katG*, G285A στο γονίδιο *oxyR* (Sreevatsan *et al.*, 1996), N88S στο γονίδιο *iniA* (Wang *et al.*, 2010), άλλα και για νέους, οι οποίοι προσδιορίζονται για πρώτη φορά και είναι οι E321 / I322V στο γονίδιο *Rv1592c* και οι P29/T203 στο γονίδιο *katG*. Χρήσιμο εργαλείο για επιδημιολογικές μελέτες αποτελούν οι πολυμορφισμοί που μπορούν να διαχωρίσουν τα *M. bovis* spp *bovis* (G64 στο γονίδιο *Rv0340*) (Andrievskaia *et al.*, 2018) από τα BCG στελέχη (A43V στο γονίδιο *furA* (Springer *et al.*, 2001) και A363T στο γονίδιο *srmR homolog*) (Zhu *et al.*, 2016).

Κανένα στέλεχος *M. tuberculosis*/*M. canettii* με αντοχή στην ισονιαζίδη δεν έφερε μη-συνώνυμη μετάλλαξη ή πολυμορφισμό στα γονίδια *efpA*, *Rv1772*, *fadE24*, *kasA*, *fabD*, *fbpc*, *iniB*, *iniC*, *oxyR*, *furA* και *srmR homolog*. Στη βιβλιογραφία, τα δεδομένα για αυτά τα γονίδια είναι περιορισμένα και σε όλες τις περιπτώσεις ανθεκτικών στελεχών με μετάλλαξη σε κάποιο από αυτά βρέθηκε ταυτόχρονα αντοχή στο *katG* και/ή *inhA* (Ramaswamy *et al.*, 2003). Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για να κατανοηθεί η σημασία των μεταλλάξεων που εντοπίζονται σε αυτά τα γονίδια.

Συγκεντρωτικά όσον αφορά την ισονιαζίδη, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν αρκετά γονίδια που σχετίζονται ή υποθετικά έχουν συσχετιστεί με αντοχή στην ισονιαζίδη. Συγκεντρωτικά, 11 (78,6%) από τα 14 ανθεκτικά στελέχη έφεραν μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντοχή στην ισονιαζίδη. Τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα και συγκρίσιμα με αυτά των προηγούμενων μελετών (Valvatne *et al.*, 2009, Jagielski *et al.*, 2014, Jagielski *et al.*, 2015, Walker *et al.*, 2015). Οι γενετικοί τόποι που έφεραν μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αντοχή στην ισονιαζίδη ήταν τα γονίδια *katG*, *inhA*, *mabA*, *nat* και οι περιοχές υποκινητών των γονιδίων *inhA* και *ahpC*, υπογραμμίζοντας τη χρησιμότητα αυτών ως γενετικών δεικτών αντοχής στην ισονιαζίδη. Ωστόσο, δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τα τεστ ευαισθησίας, αφού οι γενετικοί μηχανισμοί της αντοχής στην ισονιαζίδη σε αρκετά στελέχη παραμένουν άγνωστοι.

Συχνό εύρημα σε ευαίσθητα *M. tuberculosis*/*M. canettii* στελέχη είναι η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια σχετιζόμενα με αντοχή στην ισονιαζίδη. Εξαιρώντας τους πολυμορφισμούς, σε τέσσερα ευαίσθητα στη ισονιαζίδη στελέχη παρατηρήθηκαν

μεταλλαγές, οι οποίες δεν είχαν αναφερθεί σε μελέτες άλλων ερευνητών. Πρόκειται για τις αλλαγές L589V και V33G στο γονίδιο *iniA*, A10G στο γονίδιο *efpA*, a-80g στην *ahrc-oxvR* περιοχή. Για τα γονίδια *iniA* και *efpA*, πιθανώς καμία από αυτές τις μεταλλάξεις δεν προσδίδει αντοχή στην ισονιαζίδη, όπως έχουν φανερώσει και τα ευρήματα άλλων εργασιών για τα συγκεκριμένα γονίδια (Ramaswamy *et al.*, 2003). Όσον αφορά τον υποκινητή του γονιδίου *ahrc*, υπάρχουν κάποιες θέσεις στην *ahrc-oxvR* περιοχή όπως για παράδειγμα οι θέσεις -46 και -100 που παρουσιάζονται τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη (Seifert *et al.*, 2015, Vilchère *et al.*, 2014), χωρίς να είναι πολυμορφισμοί. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις αυτές θα μπορούσαν να οφείλονται και σε αποτυχία του τεστ ευαισθησίας (Ahmad *et al.*, 2016). Σε παλιότερη εργασία στην θέση -89 έχει βρεθεί αντικατάσταση της αδενίνης από θυμίνη ως η αιτία αντοχής στην ισονιαζίδη (Valvatne *et al.*, 2009, Lempens *et al.*, 2018). Στην ίδια θέση -89 έχει βρεθεί μετάλλαξη σε ένα ευαίσθητο *M. bovis* ssp *bovis* στέλεχος (LAR469), όπου η αντικατάσταση της αδενίνης έγινε με γουανίνη (a-89g). Ειδικότερα, η συνύπαρξη της μεταλλαγής a-89g στην *ahrc-oxvR* περιοχή με δυο σιωπηλές μεταλλάξεις T376 και P347 στο γονίδιο *katG* ενισχύει την τελευταία υπόθεση αποτυχίας του αντιβιογράμματος.

Όσον αφορά το ένα και μοναδικό στέλεχος με αντοχή στην ριφαμπικίνη εντοπίστηκε η υποκατάσταση S450L στο γονίδιο *rpoB*, συχνά αναφερόμενη ως S531L, χρησιμοποιώντας το πρότυπο αρίθμησης κωδικώνων του *Escherichia coli* (Andre *et al.*, 2017). Πληθώρα μελετών έχουν αναφέρει αυτή τη μετάλλαξη τόσο σε στελέχη με μονο-αντοχή στη ριφαμπικίνη και όσο και σε MDR/XDR στελέχη (σε ποσοστό περίπου 90%) προσδίδοντας κυρίως υψηλού επιπέδου αντοχή (Ramaswamy *et al.*, 1998, Somoskoni *et al.*, 2001, Telenti *et al.*, 1993, Casali *et al.*, 2014). Είναι φανερό ότι κατέχει κυρίαρχη θέση μεταξύ των μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή στην ριφαμπικίνη παγκοσμίως (Brandis *et al.*, 2013, Gagneux *et al.*, 2006). Σε πρόσφατες μελέτες έχει συσχετιστεί με καθόλου ή χαμηλό γενετικό κόστος (fitness cost) εξηγώντας αυτή την κυριαρχία της (Gygli *et al.*, 2017, Meftahi *et al.*, 2016). Σε ένα ευαίσθητο στέλεχος στην ριφαμπικίνη ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη I491F στο γονίδιο *rpoB*, που σε παλιότερες αναφορές αναγνωρίστηκε ως I572F χρησιμοποιώντας το σύστημα αρίθμησης του *Escherichia coli* (Andre *et al.*, 2016) και τοποθετείται εκτός της 81 bp περιοχής RRDR αυτού του γονιδίου. Σε αντίθεση με την

παρούσα εργασία έχει αναφερθεί προηγουμένως σε πολλές χώρες του κόσμου μόνο σε στελέχη με αντοχή στην ριφαμπικίνη. Γενικά, σε παλιότερες μελέτες το ποσοστό εμφάνισης της μεταξύ των RIF-R στελεχών κυμαινόταν στο 1% - 5% (Yuen *et al.*, 1999, Siu *et al.*, 2011, Bobadilla-del-Valle *et al.*, 2001, Heep *et al.*, 2001, McCammon *et al.*, 2005, Rigouts *et al.*, 2013). Το 2015 μια μελέτη της Σουαζιλάνδης υπογράμμισε την παρουσία αυτής της μετάλλαξης στο 30% MDR στελεχών, ανατρέποντας τα δεδομένα (Sanchez-Padilla *et al.*, 2015). Πρόκειται για μια πολυσυζητημένη μετάλλαξη, με αμφιλεγόμενες απόψεις προκαλώντας το ενδιαφέρον για έρευνα και έλεγχο των τρεχόντων διαγνωστικών μεθόδων καθώς και την αξιοπιστία των φαινοτυπικών μεθόδων ελέγχου της ευαισθησίας στη ριφαμπικίνη. Οι Cohen *et al.* (2015) πίστευαν ότι η μετάλλαξη I491F είναι μια αντισταθμιστική μετάλλαξη και χωρίς κανένα ρόλο στην αντοχή στη RIF (Cohen *et al.*, 2015). Ωστόσο, προγενέστερα αυτών, οι Siu *et al.* (2011) (Siu *et al.*, 2011) έδειξαν σύνδεση της θέση αμινοξέος 491 με αντοχή στη ριφαμπικίνη στο *M. tuberculosis* και οι Rigouts *et al.* (2013) θεωρούν ότι το MGIT 960 αδυνατεί να ανιχνεύσει αντοχή η οποία σχετίζεται με ειδικές μεταλλάξεις (όπως με την I491F) (Rigouts *et al.*, 2013). Σε μια μεγάλη έρευνα του 2015, η οποία περιελάμβανε στελέχη από Ηνωμένο Βασίλειο, Σιέρρα Λεόνε, Γερμανία, Ουζμπεκιστάν και Νότια Αφρική βρέθηκε η μετάλλαξη I491F στο 83% ευαίσθητων στελεχών (Walker *et al.*, 2015) ενισχύοντας την άποψη των Rigouts *et al.* Τελικά, οι Makhado *et al.* (2018) σε μια επίσης μεγάλη ανάλυση στελεχών της Νότιας Αφρικής απέδειξαν ότι η μετάλλαξη σχετίζεται με αντοχή στην ριφαμπικίνη οδηγώντας σε θεραπευτική αποτυχία και ότι υπάρχει δυσκολία να ανιχνευτεί από το MGIT 960, αφού αρκετά από τα στελέχη που τη φέρουν χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα (Makhado *et al.*, 2018). Πρόβλημα όσον αφορά τη υποκατάσταση I491F υπήρξε και με το kit Genotyping MTBDRplus Ver 2.0 (HAIN LifeScience) το οποίο δεν έχει τη δυνατότητα να την ανιχνεύσει, ενώ προσδιόρισε τη μεταλλαγή S450L. Αυτό το μειονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε αποτυχία ανίχνευσης MDR-TB στελεχών και κυρίως σε περιοχές όπως η Σουαζιλάνδης όπου αυτή έχει βρεθεί σε ποσοστό 30%. Είναι σημαντικό να προστεθεί αυτή η μετάλλαξη στο kit καθώς και άλλες συχνές υποκαταστάσεις που τοποθετούνται εκτός της 81 bp περιοχής RRDR.

Σε αυτή τη μελέτη, τα αποτελέσματα της γονιδιακή ανάλυση των ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών στην αιθαμβουτόλη ήταν διαφορούμενα. Τα τρία στελέχη με αντοχή στην αιθαμβουτόλη δεν έφεραν καμία μεταλλαγή στο γονίδιο *embB*, ενώ ένα ευαίσθητο στέλεχος (LAR325) έφερε την M306I μετάλλαξη. Επιπλέον, στα ανθεκτικά στελέχη δεν βρέθηκε μετάλλαξη σχετιζόμενη με αντοχή στα γονίδια *iniA*, *iniB*, *iniC* και *Rv0340*. Μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αντοχή στην EMB έχουν βρεθεί και σε άλλους γενετικούς τύπους, όπως οι *embA*, *embC* και η περιοχή ανοδικά του γονιδίου *embA* (βρίσκεται κοντά στον προαγωγέα του *embAB*) (Brossier *et al.*, 2015, Cui *et al.*, 2014, Giri *et al.*, 2018, Ramaswamy *et al.*, 2000). Στην βιβλιογραφία, περίπου το 30% των ανθεκτικών στην αιθαμβουτόλη στελεχών, δεν έχουν μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές, υποδηλώνοντας την ύπαρξη κάποιου διαφορετικού μηχανισμού αντοχής (Palomino *et al.*, 2014, Almeida *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2014). Η αντοχή στην αιθαμβουτόλη σχετίζεται συχνότερα (περίπου 60%) με μεταλλάξεις που απαντώνται στο κωδικόνιο 306 του γονιδίου *embB* (*embB306*) και προκαλούν υποκατάσταση της Met σε Ile ή Val ή Leu (Jain *et al.*, 2008, Belanger *et al.*, 1996, Yoon *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2009). Αρκετές μελέτες έχουν δημοσιεύσει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ αυτών των μεταλλαγών και αντοχής σε INH ή RMP (Hazbón *et al.*, 2005, Jnawali *et al.*, 2013) και σε υψηλό ποσοστό MDR στελεχών (Shen *et al.*, 2007, Jnawali *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2014, Bakula *et al.*, 2013). Ομοίως το στέλεχος, της παρούσας εργασίας, είναι ταυτόχρονα ανθεκτικό στην ισονιαζίδη με μετάλλαξη στο γονίδιο *katG* (S315T). Ενδιαφέρον είναι ότι οι υποκαταστάσεις M306V και M306L έχουν συσχετιστεί με αντοχή υψηλού επιπέδου σε EMB, ενώ η M306I με χαμηλού επιπέδου αντοχή (Zhang *et al.*, 2014, Sreenatsan *et al.*, 1997). Επιπλέον, οι Zhang *et al.* (2014), χρησιμοποιώντας για έλεγχο αντοχής της αιθαμβουτόλης τη μέθοδο μικροαραιώσεων, ταυτοποίησαν την M306I αντικατάσταση σε μεγαλύτερο ποσοστό στελεχών με MIC ελαφρώς υψηλότερη από την κρίσιμη συγκέντρωση, σε ευαίσθητα και σε χαμηλού επιπέδου αντοχή (Zhang *et al.*, 2014). Σε αρκετές μελέτες, έχει αναφερθεί η παρουσία της *embB306* σε ευαίσθητα στελέχη και κυρίως της μεταλλαγής M306I, συνήθως σε πάνω από το μισό αριθμό των ευαίσθητων στελεχών (Zhang *et al.*, 2014, Ahmad *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2004, Jnawali *et al.*, 2013, Plinke C, *et al.*, 2011, Walker *et al.*, 2015). Πολύ συχνά, οι τιμές MIC για την EMB ποικίλουν ανάλογα με το μέσο καλλιέργειας, την κατάσταση του στελέχους ή τη μέθοδο ευαισθησίας

που χρησιμοποιείται (Madison *et al.*, 2002). Τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι η αντοχή στην EMB μπορεί πράγματι να μην ανιχνευθεί φαινοτυπικά με τις συνήθεις εργαστηριακές διαδικασίες (Van Rie *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2006, Walker *et al.*, 2015). Μεγάλος αριθμός εργασιών έχουν δείξει ότι οι συμβατικές φαινοτυπικές μέθοδοι δοκιμασίας ευαισθησίας της EMB (με βάση την υγρή καλλιέργεια) είναι προβληματικές και ανακριβείς (Piersimoni *et al.*, 2006, Madison *et al.*, 2002, Campbell *et al.*, 2011, Ahmad *et al.*, 2004) και αποτελούν ένα αναπόφευκτο πρόβλημα στα διαγνωστικά εργαστήρια φυματίωσης (Kim, 2005, Van Deun *et al.*, 2011). Η υγρή καλλιέργεια MGIT 960 αναφέρει συχνά ψευδή ευαισθησία στην αιθαμβουτόλη για *M. tuberculosis* στελέχη με μεταλλάξεις *embB* που προσδίδουν χαμηλή αλλά κλινικά σημαντική αντοχή στην αιθαμβουτόλη (Spies *et al.*, 2011, Safi *et al.*, 2008, Plinke *et al.*, 2011, Starks *et al.*, 2009). Επιπλέον, ο ρόλος των μεταλλάξεων *embB306* στη δημιουργία *M. tuberculosis* στελεχών με αντοχή στην EMB επιβεβαιώθηκε πειραματικά (Safi *et al.*, 2008). Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο ευαίσθητος φαινότυπος του στελέχους LAR325 δημιουργεί ισχυρή υποψία ότι οφείλεται σε αποτυχία του τεστ ευαισθησίας (MGIT 960) της αιθαμβουτόλης. Τέλος, όλα τα *M. bovis* στελέχη, ευαίσθητα στην αιθαμβουτόλη, έφεραν την αλλαγή E378A στο γονίδιο *embB*. Πρόκειται για ένα χαρακτηριστικό πολυμορφισμό για τα *M. bovis* στελέχη ο οποίος έχει σχολιαστεί και παλιότερα (Feuerriegel *et al.*, 2014).

Το ίδιο πρόβλημα των φαινοτυπικών δοκιμασιών απαντάται σε μεγαλύτερο βαθμό στην πυραζιναμίδη. Αν και η δοκιμή ευαισθησίας του PZA MGIT 960 συνιστάται από το Π.Ο.Υ., έχει αποδειχθεί ότι η μέθοδος αποδίδει αντιφατικά αποτελέσματα και πάσχει από ένα σχετικά υψηλό ποσοστό ψευδούς αντοχής (Hoffner *et al.*, 2013, Böttger, 2011, Ramirez-Busby *et al.*, 2015). Η πυραζιναμίδη είναι ενεργή μόνο σε όξινο περιβάλλον, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων. Είναι γνωστό ότι δεν είναι εύκολο να επιτευχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα δοκιμών *in vitro* για την PZA, αφού η δραστηριότητα αυτού του φαρμάκου εξαρτάται από την οξύτητα του μέσου καλλιέργειας, καθιστώντας το φάρμακο πιο δραστικό σε ένα pH 5,5 και σχεδόν αδρανής σε ουδέτερο pH (Salfinger *et al.*, 1988). Επιπρόσθετοι παράγοντες που μπορούν εύκολα να επηρεάσουν την ακρίβεια του τεστ ευαισθησίας είναι το εναιώρημα εμβολιασμού, τα συστατικά του μέσου καλλιέργειας και η ηλικία των μυκοβακτηριακών κυττάρων (Zhang *et al.*, 2002, Piersimoni *et al.*, 2013,

Pfyffer *et al.*, 2002). Συνεπώς, η αναπαραγωγικότητα του τεστ ευαισθησίας μπορεί να παρεμποδιστεί από την έλλειψη αυστηρής τυποποίησης του pH του θρεπτικού μέσου καθώς και από ένα υπερβολικά πλούσιο ή μη ομοιογενές βακτηριακό εναιώρημα, το οποίο μπορεί να μειώσει το αποτέλεσμα της πυραζιναμίδης αυξάνοντας το pH και προκαλώντας έτσι ψευδή αντοχή (Zhang *et al.*, 2002, Hoffner *et al.*, 2013, Piersimoni *et al.*, 2013). Όπως αναμενόταν με βάση τα προαναφερθέντα, η ψευδή αντοχή είναι μια πιθανή αιτία μη εύρεσης μεταλλάξεων στα πιο κοινά σχετιζόμενα με αντοχή στην πυραζιναμίδα γονίδια *pnca*, *rpsA* και *panD* των τριών ανθεκτικών *M. tuberculosis*/*M. canettii* στελεχών. Μια άλλη αλλά λιγότερο πιθανή αιτία είναι η ύπαρξη μεταλλάξεων σε άλλους γενετικούς τόπους, όπως έδειξαν οι Sheen *et al.* (2017) έπειτα από ανάλυση του γονιδιώματος, υποστηρίζοντας πιθανούς εναλλακτικούς μηχανισμούς αντοχής της PZA. Οι ίδιοι πρώτοι ανέφεραν την μετάλλαξη L182W στο γονίδιο *pnca* σε PZA-R στέλεχος, η οποία βρέθηκε σε ένα από τα τέσσερα ανθεκτικά στελέχη της παρούσας εργασίας. Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν καταγεγραμμένα στοιχεία ελέγχου μηχανισμού αντοχής στην πυραζιναμίδα. Στα ευαίσθητα στελέχη παρατηρήθηκαν δυο σιωπηλές μεταλλάξεις, η S94 στο *pnca* γονίδιο σε CAS/Delhi στέλεχος και η A212 στο γονίδιο *rpsA* σε όλα τα Beijing στελέχη. Τα αποτελέσματα συνάδουν με τα αντίστοιχα προηγούμενων ερευνών (Feuerriegel *et al.*, 2014 Alexander *et al.*, 2012, Coll *et al.*, 2014). Το νέο εύρημα είναι η συσχέτιση αυτών των πολυμορφισμών με συγκεκριμένους κλωνικούς τύπους, STs. Το στέλεχος με ST88 έφερε τη μη συνώνυμη υποκατάσταση S94 στο γονίδιο *pnca*, ενώ όλα τα προφίλ ST3 την A212 στο γονίδιο *rpsA*. Είναι γνωστό ότι τα *M. bovis* στελέχη έχουν ενδογενή αντοχή στην πυραζιναμίδα. Ως εκ τούτου όλα τα έξι *M. bovis* έφεραν τις δύο χαρακτηριστικές μεταλλάξεις, την H57D στο γονίδιο *pnca* και την A440T στο γονίδιο *rpsA* (Walker *et al.*, 2015, Feuerriegel *et al.*, 2014, Ramirez-Busby *et al.*, 2017).

Στην παρούσα μελέτη, 13 (81,25%) από τα 16 στελέχη με αντοχή σε στρεπτομυκίνη έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια *rpsL* ή *gidB*, που έχουν συσχετιστεί με αντοχή στην στρεπτομυκίνη. Σε συμφωνία με παλιότερες μελέτες, κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε κάποια μεταλλαγή στο γονίδιο *rrs* (Feuerriegel *et al.*, 2012, Hlaing *et al.*, 2017, Siddiqi *et al.*, 2002). Γενικά, η παγκόσμια συχνότητα για το γονίδιο *rrs* κυμαίνεται 0-28% (Jagielski *et al.*, 2014, Tudó *et al.*, 2010). Ο υψηλότερος επιπολασμός των *rrs* μεταλλάξεων εμφανίζεται

στην Ευρώπη, από 13% έως 28% (Tudó *et al.*, 2010, Jagielski *et al.*, 2014), ενώ 0% βρέθηκε σε Ινδία και Σιέρα Λεόνε (Feuerriegel *et al.*, 2012, Siddiqi *et al.*, 2002). Τα στελέχη των υπολοίπων χωρών της Ευρώπης διαφέρουν χρονικά και ποσοτικά από τα υπάρχοντα στελέχη. Στην Ελλάδα δεν υπάρχει κάποια προηγούμενη αναφορά σχετικά με το γονίδιο *rrs*. Ίσως τα μεγαλύτερα αστικά κέντρα της χώρας να εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά και συμβατά με αυτά της υπόλοιπης Ευρώπης ή απλώς τα ποσοστά της χώρας μας είναι χαμηλότερα. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι η απουσία *rrs* μεταλλάξεων ήταν αποτέλεσμα των αυξημένων μεταλλάξεων στο γονίδιο *gidB*.

Στο γονίδιο *rpsL*, ταυτοποιήθηκε η K43R μετάλλαξη σε τρία (18,8%) STR-ανθεκτικά στελέχη, προσδίδοντας υψηλού επιπέδου αντοχή. Αυτή η μετάλλαξη έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με υψηλού επιπέδου αντοχή στην Γερμανία, την Ιαπωνία, την Ισπανία, τη Βραζιλία, την Κίνα και το Βιετνάμ (Meier *et al.*, 1996, Katsukawa *et al.*, 1997, Tudó *et al.*, 2010, Spies *et al.*, 2011, Nhu *et al.*, 2012, Sun *et al.*, 2016). Σχετικά με το ποσοστό ανίχνευσης αυτής της μετάλλαξη ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών, για παράδειγμα 11,6% στην Βαρκελώνη (Tudó *et al.*, 2010), 43,7% στην Πολωνία (Jagielski *et al.*, 2014), 13,2% στο Μεξικό (Cuevas-Córdoba *et al.*, 2013), 25% στη Βραζιλία (Spies *et al.*, 2011), 42,9% στη Βόρεια Ινδία (Yadav *et al.*, 2013), 52,8% στην Κορέα (Jnawali *et al.*, 2013), 62,1% στο Βιετνάμ (Nhu *et al.*, 2012), 70,4% στην Κίνα (Shi *et al.*, 2007) και 80,4% στη Σιγκαπούρη (Sun *et al.*, 2010). Αξιοσημείωτο είναι ότι οι υψηλότερες συχνότητες της υποκατάστασης K43R βρίσκονται σε περιοχές όπου κυριαρχούν τα στελέχη της οικογένειας Beijing. Ομοίως, δύο από τα τρία STR-ανθεκτικά στελέχη, που φέρουν την K43R ανήκαν στην οικογένεια Beijing και είχαν προφίλ ST3 (φυλογεωγραφική γραμμή 4). Ενώ, κανένα από τα υπόλοιπα 14 STR-R στελέχη δεν ήταν Beijing. Οι Sun *et al.* (2016) σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Nhu *et al.*, 2012, Sun *et al.*, 2010) επιβεβαίωσαν ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μετάλλαξης K43R και του γονότυπου Beijing, υποδεικνύοντας ότι ο γονότυπος Beijing παρουσιάζει ή έχει εξελικτικό πλεονέκτημα υπό την πίεση της στρεπτομυκίνης. Επιπλέον, οι Spies *et al.* (2013) αναφέραν ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν φέρει γενετικό κόστος στα μυκοβακτηρίδια ως μια άλλη αιτία υψηλού επιπολασμού μεταξύ των *M. tuberculosis* στελεχών με αντοχή σε STR. Φαίνεται ότι ο μικρός αριθμός των Beijing στελεχών ήταν μια πιθανή αιτία του

χαμηλότερου ποσοστού στα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης από ότι το μέσο εύρο των αναφερόμενων παγκόσμιων συχνοτήτων (Tudó *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2010, Zhao *et al.*, 2015, Hlaing *et al.*, 2017, Brzostek *et al.*, 2004, Perdigão *et al.*, 2008, Tracevska *et al.*, 2004, Shi *et al.*, 2007, Smittipat *et al.*, 2015, Jagielski *et al.*, 2014). Εντούτοις, τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, του Μεξικού (Cuevas-Cordoba *et al.*, 2013), της Βαρκελώνης (Tudó *et al.*, 2010) και της Ινδίας (Siddiqi *et al.*, 2002), όπου δεν ήταν συχνή η παρουσία στελεχών που ανήκαν στην οικογένεια Beijing και η μετάλλαξη K43R δεν είχε σημαντική συμβολή στην αντοχή στην στρεπτομυκίνη.

Σχετικά με το γονίδιο *gidB*, 14 από τα 16 STR-ανθεκτικά στελέχη έφεραν κάποια μετάλλαξη, εκ των οποίων δέκα στελέχη (62,5%) έφεραν μεταλλάξεις σχετιζόμενων με αντοχή στη στρεπτομυκίνη, σημειακές και μετατοπίσεις του πλαισίου ανάγνωσης. Η πλειοψηφία αυτών ήταν νέες μεταλλάξεις. Στην Ελλάδα δεν έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως έλεγχος του γονιδίου *gidB* σε *M. tuberculosis* στελέχη. Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στο γονίδιο *gidB* σε STR-R στελέχη είναι αρκετά υψηλότερη από ότι σε άλλες χώρες (Spies *et al.*, 2011, Okamoto *et al.*, 2007, Smittipat *et al.*, 2016, Jagielski *et al.*, 2014, Feuerriegel *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2015). Βρέθηκαν οι νέες υποκαταστάσεις A53D, G73V, V177L, G42S, T156R οι οποίες πιθανολογείται ότι οι νέες μεταλλάξεις εμπλέκονται με αντοχή στην στρεπτομυκίνη, αφού ούτε βρέθηκαν σε ευαίσθητα στελέχη, ούτε συνυπάρχουν ταυτόχρονα αλλαγές στο γονίδιο *rpsL*. Περαιτέρω έρευνες θα επιβεβαιώσουν την πραγματική συνεισφορά αυτών στην αντοχή στην στρεπτομυκίνη. Οι μεταλλάξεις V65G, H48Q και A138E που παρατηρήθηκαν σε στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή, έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Jagielski *et al.*, 2014, Smittipat *et al.*, 2016, Casali *et al.*, 2014, Feuerriegel *et al.*, 2012). Οι υποκαταστάσεις V65G και V177L συνυπήρχαν στο ίδιο στέλεχος. Να σημειωθεί ότι στο κωδικόνιο 146 έχει αναφερθεί από τους Verma *et al.* (2014) αντικατάσταση της θρεονίνης (T) από τη μεθειόνινη (M) αλλά όχι από την αργινίνη (R) σε στέλεχος με υψηλού επιπέδου αντοχή. Οι Verma *et al.* (2014) και μεταγενέστερα οι Pandey *et al.* (2018) δημιούργησαν μοντέλο της *gidB* πρωτεΐνης για να αναλύσουν το μηχανισμό που οδηγεί σε υψηλού επιπέδου αντοχή στη στρεπτομυκίνη. Όσον αφορά τις οι μεταλλάξεις μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου 61delC, (tgtggagcgg)90-99del (διαγραφή 10bp), 115delC και Gdel102. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις μετατόπισης

αναγνωστικού πλαισίου και κυρίως οι σχετιζόμενες με υψηλή αντοχή δεν έχει αναλυθεί και απαιτούνται περαιτέρω εργασίες για την επικύρωση αυτού του μηχανισμού. Η διαγραφή *GdeI102* που παρατηρήθηκε σε δυο στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή, δεν σχετίζεται με αντοχή, διότι έχει βρεθεί σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη σε παλιότερες μελέτες (Zhao *et al.*, 2015, Wong *et al.*, 2011, Okamoto *et al.*, 2007, Spies, *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις A205, L16R και η διπλή μετάλλαξη E92/A205 στο γονίδιο *gidB* έχουν συσχετιστεί με τις οικογένειες CAS/Delhi, LAM και Beijing και έχει αποδειχτεί ότι πρόκειται για φυλογενετικούς πολυμορφισμούς και από άλλους ερευνητές (Spies *et al.*, 2011, Feuerriegel *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2016, Jagielski *et al.*, 2014). Το νέο εύρημα ήταν η σύνδεση τους με συγκεκριμένους κλωνικούς τύπους: A205 με προφίλ ST87, L16R με προφίλ ST92 και τη διπλή μετάλλαξη E92/A205 με προφίλ ST3. Η σιωπηλή υποκατάσταση A205 ανιχνεύτηκε και σε όλα τα *M. bovis* στελέχη (Feuerriegel *et al.*, 2014.). Δυο σημαντικά συμπεράσματα για το γονίδιο *gidB* είναι ότι: 1^{ον} η ερμηνεία των μεταλλάξεων πρέπει να είναι προσεκτική εξαιτίας των φυλογενετικών πολυμορφισμών και 2^{ον} δεν υπάρχουν μεταλλάξεις σε διατηρημένες θέσεις σχετιζόμενες με αντοχή, όπως παρατηρείται σε άλλα γονίδια.

Οι αιτίες της απουσία *rrs* μεταλλάξεων και του υψηλού αριθμού *gidB* μεταλλάξεων είναι κυρίως ασαφείς. Ως πιθανή εξήγηση, ότι τα στελέχη διαφορετικών γονότυπων παρουσιάζουν διαφορετική κατανομή μεταλλάξεων αντοχής σε γονίδια *rrs*, *gidB* και *rpsL* (Lipin *et al.*, 2007, Ali *et al.*, 2009). Συνοψίζοντας, από τα δεκαέξι στελέχη με αντοχή στην στρεπτομυκίνη, τρία (18,8%) στο γονίδιο *rpsL* και δέκα (62,5%) στο γονίδιο *gidB* φέρουν μετάλλαξη που σχετίζεται με αντοχή στην στρεπτομυκίνη. Το 18,8% των STR-R στελεχών δεν είχε μεταλλάξεις σε κανέναν από τους τρεις γενετικούς τόπους που ερευνήθηκαν. Το ποσοστό είναι πολύ χαμηλότερο από προηγούμενες μελέτες στην Πολωνία (51%) (Brzostek *et al.*, 2004), στην Ισπανία (62,3%) (Tudó *et al.*, 2010), στο Μεξικό (52%) (Cuevas-Córdoba *et al.*, 2013) και στην Πορτογαλία (33,3%) (Perdigão *et al.*, 2008), στις οποίες όμως δεν μελετήθηκε το γονίδιο *gidB*. Ωστόσο, το ποσοστό ήταν παρόμοιο με αυτά άλλων χωρών που στην ερευνά τους συμπεριέλαβαν και τα τρία γονίδια όπως 5,4% στην Κίνα (Zhao *et al.*, 2015), 12,5% στην Πολωνία (Jagielski *et al.*, 2014.), 6,9% στο Βιετνάμ (Nhu *et al.*, 2012), 11,8% στην Κορέα (Ballif *et al.*, 2012), 12,5% στη Σιέρα Λεόνε

(Feuerriegel *et al.*, 2012), 19,1% στην Ταϊλάνδη (Smittipat *et al.*, 2016) και 22% στη Βραζιλία (Spies *et al.*, 2011). Από αυτά τα δεδομένα, είναι σαφές ότι υπάρχουν κάποιои άλλοι μηχανισμοί που οδηγούν σε αντοχή στην στρεπτομυκίνη. Ένας υποθετικός μηχανισμός περιλαμβάνει αλλαγές στο κυτταρικό περίβλημα που οδηγούν σε μειωμένη διαπερατότητα, μειωμένη πρόσληψη ή αυξημένη εκροή του φαρμάκου (Meier *et al.*, 1996). Ως εκ τούτου έχει προταθεί η συμβολή εναλλακτικών γονιδίων όπως η αντλία εκροής αμινογλυκοσίδης Tap (Rv1258c) και ο μεταγραφικός ρυθμιστής της, whiB7 (Rv3197A) (Zhang *et al.*, 2009, Morris *et al.*, 2005, Reeves *et al.*, 2013, Villellas C *et al.*, 2013). Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την επιβεβαίωση αυτού του μηχανισμού ή τον εντοπισμό πρόσθετων μηχανισμών που προσδίδουν αντοχή στην στρεπτομυκίνη.

Η σημαντικότητα της ταυτόχρονης χρήσης φαινοτυπικών και μοριακών μεθόδων για τον έλεγχο αντοχής των διάφορων αντιφυματικών του *Mycobacterium tuberculosis* Complex αποτελεί ένα επιπλέον σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης. Αρκετά συχνά έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των μοριακών και φαινοτυπικών μεθόδων αντοχής (Walker *et al.*, 2015, Ahmad *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2014, André *et al.*, 2017). Όπως σχολιάστηκε, παραπάνω η μέθοδος MGIT που αποτελεί την μέθοδο αναφοράς του ελέγχου ευαισθησίας αποτυγχάνει σε αρκετές περιπτώσεις να χαρακτηρίσει τα ανθεκτικά στελέχη. Μια πληθώρα μελετών έχουν αποδείξει αυτό το σημαντικό έλλειμμα των τεστ ευαισθησίας (DST)(Walker *et al.*, 2015, Makhado *et al.*, 2018). Μεταξύ των αντιφυματικών φαρμάκων που υστερούν στην παροχή σωστών αποτελεσμάτων ευαισθησίας, κυρίαρχη θέση κατέχουν η πυραζιναμίδη και η αιθαμβουτόλη (Yip *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2014, Hoffner *et al.*, 2013, Ramirez-Busby *et al.*, 2015). Αυτό αποτελεί εμπόδιο στην χρήση αυτών των τεστ στο σχεδιασμό εξατομικευμένης θεραπείας σε MDR-TB και XDR-TB περιπτώσεις. Η μέθοδος των μικροαραιώσεων αποκάλυψε για την αιθαμβουτόλη και την ισονιαζίδη καλύτερη συσχέτιση μεταλλάξεων-αντοχής (Zhang *et al.*, 2014, Chan *et al.*, 2007). Κατά συνέπεια, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να καθιερωθεί μια πιο αξιόπιστη μέθοδος ή βελτίωση της ήδη υπάρχουσας μεθόδου MGIT για την ανίχνευση της ευαισθησίας των MTBC στελεχών. Επιπλέον, θα ήταν χρήσιμο να επαναπροσδιοριστούν τα όρια αντοχής για τα αντιφυματικά φάρμακα και κυρίως να ελεγχθεί η χαμηλή κρίσιμη συγκέντρωση προς αποφυγή των

ψευδώς ευαίσθητων αποτελεσμάτων (Böttger, 2011). Στον αντίποδα, οι μοριακές μέθοδοι ελέγχου αντοχής παρέχουν γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Ωστόσο, είναι γνωστό από την παρούσα άλλα και παλιότερων ερευνών ότι οι μεταλλάξεις δεν προσδίδουν όλες αντοχή στα αντιφυματικά και ότι το *M. tuberculosis* φέρει στο γονιδίωμα του πολλούς πολυμορφισμούς. Επιπλέον, συνεχώς ανιχνεύονται νέες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του MTBC με άγνωστο ρόλο δημιουργώντας την ανάγκη επιπρόσθετων προσεγγίσεων, όπως η ανάλυση κρυσταλλογραφικών πρωτεϊνών ή η *in-vitro* μεταλλαξογένεση.

Από την ανάλυση όλων των γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή στα κύρια αντιφυματικά, σε δεκατέσσερα δομικά γονίδια (*katG*, *mshA*, *iniA*, *Rv0340*, *ndh*, *nat*, *furA*, *aacD6*, *srmR homolog*, *oxyR*, *Rv1592c*, *pncA*, *rpsA*, *gidB*) και στη διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* των 54 κλινικών στελεχών *M. tuberculosis* Complex προέκυψαν μεταλλάξεις που δεν προσέδιδαν αντοχή άλλα εμφανίζονταν σε συγκεκριμένους γονοτύπους και κλωνικούς τύπους, όπως προαναφέρθηκε. Οι πολυμορφισμοί αυτοί ήταν γνωστοί άλλα βρέθηκαν και νέοι φυλογενετικά πληροφοριακοί δείκτες. Για πρώτη φορά αυτοί οι πολυμορφισμοί συσχετίστηκαν με προφίλ ST. Το *Mycobacterium tuberculosis* Complex φέρει αρκετούς πολυμορφισμούς σε γονίδια που έχουν συσχετιστεί με αντοχή στα πρώτης και δεύτερης γραμμής αντιφυματικά. Η ανάλυση αυτών των γονιδίων πραγματοποιείται όλο και περισσότερο για να συναχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα συμπέρασμα σχετικά με τη φαινοτυπική αντοχή. Σε αυτό έρχεται να προστεθεί και η χρήση της αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος, η οποία είναι ικανή να ανιχνεύσει μεταλλάξεις σε γονίδια σχετιζόμενα με αντοχή σε όλα τα αντιφυματικά. Για την ακριβή και σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η κατανόηση της σχέσης γονότυπου-φαινοτύπου, και κυρίως η διάκριση των μεταλλάξεων που δεν σχετίζονται με αντοχή. Ιδιαίτερως απαραίτητη είναι η γνώση και ο διαχωρισμός των μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στα αντιφυματικά από αυτές που σχετίζονται με συγκεκριμένες φυλογενετικές οικογένειες ή κλωνικούς τύπους. Οι πολυμορφισμοί μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμο εργαλείο για επιδημιολογικές μελέτες άλλα και για διαγνωστικούς σκοπούς. Είναι γνωστό ότι κάποιοι γονότυποι όπως για παράδειγμα ο Beijing φέρουν αρκετές αντοχές στα διάφορα αντιφυματικά, είναι πιο μολυσματικοί και μεταδοτικοί. Η δημιουργία εμπορικών κιτ βασισμένων στους πολυμορφισμούς, οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν ως φυλογενετικοί

δείκτες για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών γενεολογικών ομάδων, θα παράσχει αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα συμβάλλοντας στην μείωση της εξάπλωσης της φυματίωσης. Η έγκυρη ερμηνεία του μεγάλου όγκου πληροφοριών που προκύπτουν από την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος και από την ανάλυση της αλληλουχίας της επόμενης γενιάς μπορεί να επιτευχθεί.

Συμπεράσματα

- Η συχνότητα απομόνωσης στελεχών *M. tuberculosis* Complex με αντοχή στα πρώτης και δεύτερης γραμμής αντιφυματικά φάρμακα βρέθηκε σε ποσοστό 11,69%.
- Η πλειοψηφία των στελεχών *M. tuberculosis/M. canettii* εμφάνισε αντοχή στην στρεπτομυκίνη (6%) με μικρή διαφορά από την ισονιαζίδη (5.2%). Τα υπόλοιπα αντιφυματικά κυμάνθηκαν σε χαμηλά ποσοστά, η πυραζιναμίδη (1,5%), η αιθαμβουτόλη (1,1%) και η ριφαμπικίνη (0,4%).
- Τα στελέχη *M. bovis* ήταν όλα ανθεκτικά μόνο στην πυραζιναμίδη.
- Ο έλεγχος ευαισθησίας στα στελέχη που προέκυψαν δεν ανέδειξε MDR-TB ούτε XDR-TB στελέχη.
- Η μέθοδος MST εφαρμόστηκε 1^η φορά στην Ελλάδα και 2^η φορά στην Ευρώπη.
- Το υψηλότερο ποσοστό των στελεχών *M. tuberculosis/M. canettii* είχε προφίλ ST6 (20.8%), ST13 (14.6%) και ST3 (12.5%).
- Τα περισσότερα στελέχη *M. tuberculosis/M. canettii* ανήκαν στις οικογένειες Haarlem (33,3%), S-type (16,7%) και Beijing (12,5%).
- Από τη συσχέτιση των μεθόδων MIRU-VNTR και MST, προέκυψε ως επικρατέστερη η γενεολογία Euro-American (lineage 4). Ο συνδυασμός των δυο μεθόδων επιτυγχάνει καλύτερη επιδημιολογική ανάλυση.
- Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των προφίλ ST και της αντοχής τους στα αντιφυματικά
- Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των φυλογενετικών οικογενειών MIRU-VNTR και της αντοχής τους στα αντιφυματικά
- Η μέθοδος αναφοράς του ελέγχου ευαισθησίας MGIT 960 αποτυγχάνει σε ορισμένες περιπτώσεις να χαρακτηρίσει τα ανθεκτικά στελέχη.
- Σε ποσοστό 78,6% των ανθεκτικών σε ισονιαζίδη στελεχών *M. tuberculosis/M. canettii* βρέθηκαν μεταλλάξεις που σχετίζονται με αντοχή στην ισονιαζίδη. Μεταλλαγές ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *katG*, στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *inhA*, στην διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC*, στη δομική περιοχή του γονιδίου *inhA* και στο γονίδιο *mabA*.

- Το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων της εμπορικής δοκιμασίας GenoType MTBDRplus Ver 2.0 (HAIN LifeScience) ήταν χαμηλό, 28,6%, αναδεικνύοντας την αποτυχία της στην ανίχνευση των μεταλλάξεων.
- Στο στέλεχος με αντοχή στην ριφαμπικίνη βρέθηκε η πιο διαδεδομένη υποκατάσταση, η S450L στο *rpoB* γονίδιο
- Τα τρία στελέχη με αντοχή στην αιθαμβουτόλη δεν έφεραν καμία μεταλλαγή στο *embB* γονίδιο
- Μόνο σε ένα από τα τέσσερα στελέχη *M. tuberculosis/ M. canettii* με αντοχή στην πυραζιναμίδα βρέθηκε μετάλλαξη (L182W) γονίδιο *pncA*
- Το 81,3% των ανθεκτικών σε στρεπτομυκίνη στελεχών *M. tuberculosis/M. canettii* έφερε μεταλλάξεις, σχετιζόμενες με αντοχή στην στρεπτομυκίνη, στα γονίδια *rpsL* ή *gidB* και καμία στο γονίδιο *rrs*. Στα περισσότερα στελέχη βρέθηκαν μεταλλαγές στο γονίδιο *gidB*.
- Στα δομικά γονίδια *katG*, *mshA*, *iniA*, *Rv0340*, *ndh*, *nat*, *furA*, *aacD6*, *srmR homolog*, *oxyR*, *Rv1592c*, *pncA*, *rpsA*, *gidB* και στη διαγονιδιακή περιοχή *oxyR-ahpC* των στελεχών *M. tuberculosis* Complex βρέθηκαν πολυμορφισμοί οι οποίοι μπορούν να είναι χρήσιμοι φυλογενετικοί δείκτες για επιδημιολογικές μελέτες.
- Η μελέτη αυτή αποκαλύπτει την πολυπλοκότητα της εξέλιξης της αντοχής των αντιφυματικών φαρμάκων

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abate G, Hoffner SE, Thomsen VO, Miörner H. Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 2001: 20(5):329-33.
- Abbadi SH, Sameaa GA, Morlock G, Cooksey RC. Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Infect Dis., 2009: 13: 673–678.
- Abe C, Kobayashi I, Mitarai S et al. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. J Clin Microbiol., 2008: 46: 2263–2268.
- Afnas'ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN, Sidorenko SV, Kuz'min AV, Larionova EE, Smirnova TG, Chernousova LN, Kamaev EY, Skorniakov SN, Kinsht VN, Cherednichenko AG, Govorun VM. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. J Antimicrob Chemother., 2007: 59(6):1057-1064.
- Agarwal R, Kumar V, Jindal SK. Obstructive granulomatous bronchiolitis obliterans due to *Mycobacterium tuberculosis*. Monaldi Arch Chest Dis., 2005: 63(2):108-110.
- Ahmad S, Jaber AA, Mokaddas E. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. Tuberculosis, 2007: 87:123-129.
- Ahmad S, Mokaddas E. Contribution of AGC to ACC and other mutations at codon 315 of the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Middle East. Int J Antimicrob Agents., 2004: 23: 473-479.
- Ahmad S, Mokaddas E, Al-Mutairi N, Eldeen HS, Mohammadi S. Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Low TB Incidence Country. PLoS One., 2016: 20, 11(4): e0153563.
- Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Respir Med., 2009: 103: 1777–1790.

- Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Dev Immunol., 2011: 814943.
- Ahmad S. Why Phenotypic Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* to First-Line Drugs is not Sufficient for Proper Management of Drug-Resistant and Multidrug-Resistant Tuberculosis? J Bacteriol Parasitol, 2018: 9:1
- Ahmad S, Jaber AA, Mokaddas E. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. Tuberculosis (Edinb.), 2007: 87, 123–129,
- Aínsa JA, Blokpoel MC, Otal I, Young DB, De Smet KA, Martín C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol., 1998: 180: 5836– 5843.
- Akcali S, Cicek C, Surucuoglu S, Ozbakkaloglu B. E-test: an alternative method for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Med. Princ. Pract., 2005: 14:264-267.
- Albanna AS, Reed MB, Kotar KV, Fallow A, McIntosh FA, Behr MA, Menzies D. Reduced transmissibility of East African Indian strains of *Mycobacterium tuberculosis*. PloS one., 2011:6(9): e25075
- Albert H, Bwanga F, Mukkada S, Nyesiga B, Ademun JP, Lukyamuzi G, Haile M, Hoffner S, Joloba M, O'Brien R. Rapid screening of MDR-TB using molecular line probe assay is feasible in Uganda. BMC Infect Dis., 2010:10:41.
- Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. A. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Antimicrob Agents Chemother., 1997: 41(10):2270-2273.
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis. 2010:1296–1299.
- Alexander DC, Ma JH, Guthrie JL, Blair J, Chedore P, Jamieson FB. Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a role for *pncA* but not *rpsA*. J Clin Microbiol., 2012: 50(11):3726–3728.

- Alexander DC, Ma JH, Guthrie JL, Blair J, Chedore P, Jamieson FB. Reply to 'role of *rpsA* gene sequencing in diagnosis of pyrazinamide resistance'. *J. Clin. Microbiol.*, 2013: 51, 383.
- Alexander KA, Laver PN, Williams MC, Sanderson CE, Kanipe C, Palmer MV. Pathology of the Emerging *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *Mycobacterium mungi*, in the Banded Mongoose (*Mungos mungo*). *Vet Pathol.*, 2018: 55(2):303-309.
- Alexander WJ, Avent CK, Bailey WC. Simple primary tuberculosis in an elderly woman. *J Am Geriatr Soc* 1979: 27:123-125.
- Al-Humadi HW, Al-Saigh, RJ, Al-Humadi, AW. Addressing the Challenges of Tuberculosis: A Brief Historical Account. *Frontiers in pharmacology.*, 2017:8, 1-10.
- Ali A, Hasan Z, McNerney R, Mallard K, Hill-Cawthorne G, Coll F, Nair M, Pain A, Clark TG, Hasan R. Whole genome sequencing based characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan. *PLoS One.*, 2015 :26;10(2): e0117771.
- Ali A, Hasan Z, Moatter T, Tanveer M, Hasan R. *M. tuberculosis* Central Asian Strain 1 MDR isolates have more mutations in *rpoB* and *katG* genes compared with other genotypes. *Scand J Infect Dis.*, 2009: 41: 37-44.
- Alland D, Kramnik I, Weisbrod TR, Otsubo L, Cerny R, Miller LP, Jacobs WR, Jr, Bloom BR. Identification of differentially expressed mRNA in prokaryotic organisms by customized amplification libraries (DECAL): the effect of isoniazid on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1998: 95:13227–13232.
- Alland D, Steyn AJ, Weisbrod T, Aldrich K, Jacobs WR JR. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* iniBAC promoter, a promoter that responds to cell wall biosynthesis inhibition. *J Bacteriol.*, 2000: 182: 1802–1811.
- Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR plus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolates. *J Clin Microbiol.*, 2008: 46: 2692-2699.
- Allix-Beguec, C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2008: 46, 1398–1406.

- Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. J Antimicrob Chemother., 2011: 66: 1417–1430.
- American Thoracic Society, CDC, Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis. MMWR Recommendations and Reports., 2003: 52(RR-11): 1–77
- American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am Rev Respir Dis., 1990: 142:940–953.
- Anastasakos V, Skouras V, Moschos C, Tsikrika S, Karabela S, Marinou I, Vogiatzakis E, Konstantinou K, Papavasiliou A, Kalomenidis I. Patterns of drug resistance among patients with tuberculous pleural effusion in Greece. Int J Tuberc Lung Dis., 2017: 21(3):309-313.
- Andini N, Nash KA. Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex is inducible. Antimicrob Agents Chemother., 2006: 50(7):2560-2562.
- Ando H, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kato S, Mori T, Kirikae T. Downregulation of *katG* expression is associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol., 2011: 79:1615–1628.
- Ando H, Miyoshi-Akiyam T, Watanabe S, Kirikae T. A silent mutation in *mabA* confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol., 2014: 91(3):538-47.
- Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, Beckert P, Kabamba Mukadi B, Mathys V, Gagneux S, Niemann S, Van Ingen J, Cambau E. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. Clin Microbiol Infect., 2017: 23:167–172.
- André E, Goeminne L, Colmant A, Beckert P, Niemann S, Delmee M. Novel rapid PCR for the detection of Ile491Phe *rpoB* mutation of *Mycobacterium tuberculosis*, a rifampicin-resistance-conferring mutation undetected by commercial assays, Clin Microbiol Infect., 2017: 23(4):267.
- Andrievskaia O, Duceppe MO, Lloyd D. Genome Sequences of Five *Mycobacterium bovis* Strains Isolated from Farmed Animals and Wildlife in Canada. Genome Announc., 2018: 6(15): e00258-18.

- Ano, H., Matsumoto, T., Suetake, T., Nagai, T., Tamura, Y., Takamatsu, I., Iwasaki, T., Matsuoka, H., Sasada, S., Tetsumoto, S. Relationship between the isoniazid-resistant mutation katG S315T and the prevalence of MDR-/XDR-TB in Osaka, Japan. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2008: 12, 1300-1305
- Ano H, Matsumoto T, Suetake T, Nagai T, Tamura Y, Takamatsu I, Iwasaki T, Matsuoka H, Sasada S, Tetsumoto S, Tsuyuguchi I, Kusunoki Y, Takashima T. Relationship between the isoniazid-resistant mutation katGS315T and the prevalence of MDR-/XDR-TB in Osaka, Japan. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2008: 12(11):1300-1305.
- Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, Leiva T, Sccapatticio A, Alviz P, Fernández J. Detection of genes associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Chile. *Rev Med Chil.*, 2011:139(4):467-473.
- Arias M, Mello FC, Pavon A, Marsico AG, Alvarado-Galvez C, Rosales S, Pessoa CL, Perez M, Andrade MK, Kritski AL, Fonseca LS, Chaisson RE, Kimerling ME, Dorman SE. Clinical evaluation of the microscopic-observation drug-susceptibility assay for detection of tuberculosis. *Clin Infect Dis.*, 2007: 44: 674–680.
- Arora J, Singh UB, Suresh N, Rana T, Porwal C, Kaushik A, Pande JN. Characterization of predominant *Mycobacterium tuberculosis* strains from different subpopulations of India. *Infect Genet Evol.*, 2009: 9: 832-839.
- Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1999 :25;96(11):6161-6165.
- Asmar S, Drancourt M. Rapid culture-based diagnosis of pulmonary tuberculosis in developed and developing countries. *Front Microbiol.*, 2015: 3; 6:1184.
- Augustynowicz-Kopec E, Jaworski A, Zwolska Z. Evaluation of the Bactec MGIT 960 fluorescent method in diagnosis of tuberculosis. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2002:70: 450-457.
- Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Jaworski A, Kostrzewa E, Klatt M. Drug-resistant tuberculosis in Poland in 2000: second national survey and comparison with the 1997 survey. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2003: Jul;7(7):645-651

- Azé J, Sola C, Zhang J, Lafosse-Marin F, Yasmin M, Siddiqui R, et al. Genomics and machine learning for taxonomy consensus: the *Mycobacterium tuberculosis* complex paradigm. PLoS One. 2015; 10: e0130912.
- Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD, Drobniewski FA. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC* -46A polymorphism. Antimicrob Agents Chemother., 2005; 49(4):1455-1464.
- Bakonyte D, Baranauskaite A, Cicenaitė J, Sosnovskaja A, Stakenas P. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. Antimicrob Agents Chemother., 2003; 47: 2009–2011.
- Bakała Z, Napiórkowska A, Bielecki J, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Jagielski T. Mutations in the *embB* Gene and Their Association with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Poland. BioMed Research International., 2013: 5.
- Bald D, Koul A. Respiratory ATP synthesis: the new generation of mycobacterial drug targets? FEMS Microbiol. Lett., 2010: 308, 1–7.
- Ballif M, Harino P, Ley S, Coscolla M, Niemann S, Carter R, Coulter C, Borrell S, Siba P, Phuanukoonnon S, Gagneux S, Beck HP. Drug resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* from Madang, Papua New Guinea. BMC Microbiol., 2012; 4;12:191.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR Jr. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science., 1994;14;263(5144):227-230.
- Banerjee A, Sugantino M, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. Microbiology., 1998;144:2697-704.
- Borrell S, Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect., 2011; 17:815–820.

- Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017; 58(1): E9-E12.
- Bardou F, Raynaud C, Ramos C, Lanéelle MA, Lanéelle G. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.*, 1998; 144(Pt 9):2539–2544.
- Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.*, 2001; 39(7):2453-7.
- Basso LA, Zheng R, Musser JM, Jacobs WR, Jr, Blanchard JS. 1998. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis.*, 1998; 178:769–775.
- Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, Cloeckert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 3729–3735.
- Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miørner H. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark, *J Clin Microbiol.*, 1999; 37(8):2602-2606.
- Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusová K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996; 93: 11919-11924.
- Belisle JT, Brennan PJ. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J. Bacteriol.*, 1989; 171: 3465-3470.
- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science.*, 1997;276:1420–1422.
- Bercovier H, Kafri O, Sela S. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987; 136: 1136–1141.

- Bergstrom DE, Zhang P, Johnson WT. Comparison of the base pairing properties of a series of nitroazole nucleobase analogs in the oligodeoxyribonucleotide sequence 5'-d(CGCXAATTYGCG)-3'. *Nucleic Acids Res.*, 1997: 25(10):1935-1942.
- Bernstein, J, Lott WA, Steinberg BA, Yale HL. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *Am Rev Tuberc.*, 1952: 65(4):357-364.
- Besra GS, Morehouse CB, Rittner CM, Waechter CJ, Brennan PJ. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J Biol Chem.*, 1997: 272:18460-18466.
- Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.*, 2002: 43:717– 731
- Bhakta S, Besra GS, Upton AM, Parish T, Sholto-Douglas-Vernon C, Gibson KJ, Knutton S, Gordon S, DaSilva RP, Anderton MC, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase is required for synthesis of mycolic acids and complex lipids in *Mycobacterium bovis* BCG and represents a novel drug target. *J Exp Med.*, 2004: 199:1191–1199
- BhanuRekha V, Gunaseelan L, Pawar G, Nassiri R, Bharathy S. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* from bovine milk samples. *J Advan Vet Anim Res.*, 2014: 2(1):80–83.
- Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex (MAC). *Vet. Res.*, 2005: 36, 411-436.
- Bishai JD, Bishai WR, Bishai DM. Heightened vulnerability to MDR-TB epidemics after controlling drug-susceptible TB. *PLoS One.*, 2010: 5: e12843.
- Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens MR, Chakravorty S, Jones M, Alland D. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol.*, 2010: 48: 2495-2501.
- Blanchard JS. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem.*, 1996: 65: 215–239.
- Bloemberg GV, Voit A, Rittera C, Deggim V, Böttgera EC. Evaluation of Cobas TaqMan MTB for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in comparison with Cobas Amplicor MTB. *J Clin Microbiol.*, 2013: 51(7):2112–2117.

- Blouin Y, Cazajous G, Dehan C, Soler C, Vong R, Hassan MO, Hauck Y, Boulais C, Andriamanantena D, Martinaud C, Martin É, Pourcel C, Vergnaud G. Progenitor “*Mycobacterium canettii*” clone responsible for lymph node tuberculosis epidemic, Djibouti. *Emerg Infect Dis.*, 2014: 20(1):21-28.
- Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-Leon A, Arenas-Huertero C, Vargas-Alarcon G, Kato-Maeda M, Small PM, Couary P, Ruiz-Palacios GM, Sifuentes-Osornio J. *rpoB* Gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerg Infect Dis.*, 2001: 7(6):1010-1013.
- Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med.*, 2010: 363:1005-1015
- Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis.*, 2003: 83, 98–106.
- Booniam S, Chaiprasert A, Prammananan T, Leechawengwongs M. Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. *Clin Microbiol Infect.* 2010 :16(4):396-399.
- Bothamley G. The Tuberculosis Network European Trials Group (TBNET): new directions in the management of tuberculosis. *Breathe (Sheff).* 2017: 13(3): e65-e71.
- Böttger EC, Springer B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *Eur. J. Pediatr.*, 2008: 167: 141–148.
- Böttger EC. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.*, 2011: 17(8):1128-1134.
- Braden CR, Morlock GP, Woodley CL, Johnson KR, Colombel AC, Cave MD, Yang Z, Valway SE, Onorato IM, Crawford JT. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Infectious Diseases.*, 2001: 33: 42-47.
- Brandis G, Hughes D. Genetic characterization of compensatory evolution in strains carrying *rpoB* Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.*, 2013: 68: 2493e7.

- Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.*, 1995; 64: 29–63.
- Brennan, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*., 2003: 83:91-97.
- Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and Homo sapiens. *Immunological reviews.*, 2015: 264(1):6–24.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2002: 99:3684-3689.
- Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.*, 2001: 9: 452–458.
- Brossier F, Sougakoff W, Bernard C, Petrou M, Adeyema K, Pham A, Molecular analysis of the embCAB locus and embR gene involved in ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in France. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2015: 59(8):4800–4808.
- Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Molecular Investigation of Resistance to the Antituberculous Drug Ethionamide in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2011: 55(1):355-360.
- Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance. *J Clin Microbiol.*, 2006: 44:3659– 3664.
- Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K, Holdstock J, Houniet DT, Chan JZ, Depledge DP, Nikolayevskyy V, Broda A, Stone MJ, Christiansen MT, Williams R, McAndrew MB, Tutill H, Brown J, Melzer M, Rosmarin C, McHugh TD, Shorten RJ, Drobniowski F, Speight G, Breuer J. Rapid whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.*, 2015: 53:2230-2237.

- Brown T, Nikolayevskyy V, Velji P, Drobniewski F. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Phenotypes. *Emerging Infectious Diseases.*, 2010: 16: 272-280.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Guttierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaia O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofa-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rüsck-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* Complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.*, 2006: 6;6:23.
- Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom JA, Prins JM, Peeters MF, Claas EC, Kuijper EJ. Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children, *J Clin Microbiol.*, 2004: 42: 2644-2650.
- Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, Grandjean L, Monteserin J, Debech N, Bohlin J, Alfsnes K, Pettersson JO, Kirkeleite I, Fandinho F, da Silva MA, Perdigao J, Portugal I, Viveiros M, Clark T, Caws M, Dunstan S, Thai PVK, Lopez B, Ritacco V, Kitchen A, Brown TS, van Soolingen D, O'Neill MB, Holt KE, Feil EJ, Mathema B, Balloux F, Eldholm V. Global expansion of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Sci Adv.*, 2018 :7;4(10): e5869
- Brzostek A, Sajduda A, Sliwiński T, Augustynowicz-Kopec E, Jaworski A, Zwolska Z, Dziadek J. Molecular characterization of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2004: 8(8):1032-1035.
- Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J. *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J. Bacteriol.*, 2009: 191, 6584-6591.

- Buchmeier NA, Newton GL, Koledin T, Fahey RC. Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. *Mol. Microbiol.*, 2003: 47:1723-1732
- Burgess RR, Erickson B, Gentry D, Gribskov M, Hager D, Lesley S, Strickland M, Thompson N. Bacterial RNA polymerase subunits and genes. In: *RNA Polymerase and the Regulation of Transcription*. Reznikoff WS, Burgess RR, Dahlberg JE, Gross CA, Record MT Jr, Wickens MP, eds, Elsevier Science Publications Co., Inc. 1987: 3-15.
- Burian J, Ramon-Garcia S, Sweet G, Gomez-Velasco A, Av-Gay Y, Thompson CJ. The mycobacterial transcriptional regulator *whiB7* gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. *J Biol Chem.*, 2012: 287(1):299–310.
- Burian J, Yim G, Hsing M, Axerio-Cilies P, Cherkasov A, Spiegelman GB, Thompson CJ. The mycobacterial antibiotic resistance determinant *WhiB7* acts as a transcriptional activator by binding the primary sigma factor *SigA* (*RpoV*). *Nucleic Acids Res.*, 2013: 41(22):10062–10076.
- Butler W R, Floyd M M, Silcox V, Cage G, Desmond E, Duffey P S, Guthertz L S, Gross W M, Jost K C, Jr, Ramos L S, Thibert L, Warren N. Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. Atlanta, Ga: Centers for Disease Control and Prevention; 1996
- Caminero JA, Scardigli A, Classification of antituberculosis drugs: a new proposal based on the most recent evidence., *Eur Respir J.* 2015: 46(4):887-893.
- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 2001;104:901–912
- Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, Hooks DP, Cowan LS, Plikaytis BB, Posey JE. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2011: 55:2032–2041.
- Cardoso RF, Cardoso MA, Leite CQ, Sato DN, Mamizuka EM, Hirata RD, de Mello FF, Hirata MH. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 2007: 102(1):59-61.

- Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQ, Sato DN, Shikama Mde L, Mamizuka EM, Hirata RD, Hirata MH. Screening and characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004: 48:3373–3381.
- Cardullo R.A., Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1988: 85: 8790-8794.
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Corander J, Bryant J, Parkhill J, Nejentsev S, Horstmann RD, Brown T, Drobniowski F. Evolution and transmission of drug resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet.*, 2014: 46(3): 279–286.
- Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Ignatyeva O, Kontsevaya I, Harris SR, Bentley SD, Parkhill J, Nejentsev S, Hoffner SE, Horstmann RD, Brown T, Drobniowski F. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res.*, 2012: 22:735–745.
- Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT, Stepniwska K, Huyen MN, Bang ND, Loc TH, Gagneux S, van Soolingen D, Kremer K, van der Sande M, Small P, Anh PT, Chinh NT, Quy HT, Duyen NT, Tho DQ, Hieu NT, Torok E, Hien TT, Dung NH, Nhu NT, Duy PM, van Vinh Chau N, Farrar J. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. 2008: 4(3): e1000034.
- Caws M, Wilson SM, Clough C, Drobniowski F. Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.*, 2000:38:3150–3155.
- Caws M, Duy PM, Tho DQ, Lan NT, Hoa DV, Farrar J. Mutations prevalent among rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology.*, 2006: 44(7), 2333-2337.
- Cha SB, Shin SJ. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and BCG-based vaccines against tuberculosis. *J Bacteriol Virol.*, 2014: 44:236-243.

- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyer PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nuci Acids Res.*, 1988; 16: 11141-11156.
- Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, AuYeang CK, Yeung CY, Kam KM, Yip PC, Cheng AF. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007; 59:866 –873.
- Chandrasekaran P, Saravanan N, Bethunaickan R, Tripathy S. Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis. *Front Immunol.*, 2017; 8:1316.
- Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011; 55:4499–4505
- Chapman J, Bernard J. The tolerances of unclassified mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.*, 1962; 86: 582–583.
- Cheema, S., Khuller G. K. Metabolism of phospholipids in *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 in the presence of ethambutol. *Indian J Med Res.*, 1985; 82: 207-213.
- Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2000;44: 528–532.
- Chiang CY, Hsu CJ, Huang RM, Lin TP, Luh KT. Antituberculosis drug resistance among retreatment tuberculosis patients in a referral center in Taipei. *J Formos Med Assoc.*, 2004; 103(6):411-415.
- Christensen H, Garton NJ, Horobin RW, Minnikin DE, Barer MR. Lipid domains of mycobacteria studied with fluorescent molecular probes. *Molecular Microbiology.*, 1999; 31, 11561–11572.
- Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, and Kim JK. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res.*, 2007; 35: e40.
- Clemente WT, Soares Lima SS, Palaci M, Silva MS, Sumnienski Rodrigues VF, Dalla Costa ER, Possuelo L, Cafrune PI, Ribeiro FK, Gomes HM, Serufo JC. Phenotypic and genotypic

- characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2008; 62: 199–204.
- Coelho MB, Costa ER, Vasconcellos SE, Linck N, Ramos RM, Amorim HL, Suffys PN, Santos AR, Silva PE, Ramos DF, Silva MS, Rossetti ML. Sequence and structural characterization of tb *nat* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: identification of new mutations. *Mutat Res.*, 2011;1;712(1-2):33-39.
- Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, Walker BJ, Bantubani N, Almeida DV, Alvarado L, Chapman SB, Mvelase NR, Duffy EY, Fitzgerald MG, Govender P, Gujja S, Hamilton S, Howarth C, Larimer JD, Maharaj K, Pearson MD, Priest ME, Zeng Q, Padayatchi N, Grosset J, Young SK, Wortman J, Mlisana KP, O'Donnell MR, Birren BW, Bishai WR, Pym AS, Earl AM. Evolution of extensively drug-resistant tuberculosis over four decades: whole genome sequencing and dating analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS Med.*, 2015;12: e1001880.
- Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis.*, 2003;3: 13–21.
- Cohn DL, O'Brien RJ. The use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis for epidemiological studies of tuberculosis in developing countries. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.*, 1998; 2: 16-26.
- Colangeli R, Helb D, Sridharan S, Sun J, Varma-Basil M, Hazbon MH, Harbacheuski R, Megjugorac NJ, Jacobs WR, Jr, Holzenburg A, Sacchettini JC, Alland D. The *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol.*, 2005; 55:1829–1840
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.*, 1998; 11;393(6685):537-544.

- Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção J, Glynn J, Perdigão J, Viveiros M, Portugal I, Pain A, Martin N, Clark TS. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat. Commun.*, 2014: 5:4812.
- Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, Galagan J, Niemann S, Gagneux S. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet.*, 2012:44:106-110.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet.*, 2013 :45(10):1176-1182.
- Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog.*, 2009: 5:e1000600.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*. Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLoS ONE.*, 2009: 4(11): e7815.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One.*, 2009: 4:e7815.
- Conville PS, Witebsky FG. Variables affecting results of sodium chloride tolerance test for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1998: 36(6):1555-1559.
- Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother.*, 1996: 40: 1186–1188.
- Coscolla M, Gagneux S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? Drug discovery today Disease mechanisms. 2010: 7(1):e43–e59.
- Coscolla, M., Gagneux, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in immunology.* 2014: 26,431–444.

- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis.*, 1998; 4:59–70.
- Crofton J, Mitchison D. Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *Br Med J.*, 1948; 2: 1009.
- Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.*, 2004; 42(5): 2321-2325.
- Cuevas-Córdoba B, Cuellar-Sánchez A, Pasissi-Crivelli A, Santana-Álvarez CA, Hernández-Illezcas J, Zenteno-Cuevas R. *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *J Microbiol Immunol Infect.*, 2013; 46(1):30-34.
- Cui Z, Li Y, Cheng S, Yang H, Lu J, Hu Z, Ge B. Mutations in the *embC-embA* intergenic region contribute to *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2014;58(11):6837–6843.
- Cummings KJ. Tuberculosis control: challenges of an ancient and ongoing epidemic. *Public Health Rep.*, 2007 ;122(5):683-692.
- Daffe M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology.*, 1998; 39, 131–203.
- Dale JW. Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur. Respir. J. Suppl.*, 1995;20:633s–648s
- Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PE, Fonseca Lde S, Ho JL, Kritski AL, Rossetti ML. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.*, 2009; 19;9:39.
- Damtie D, Woldeyohannes D, Mathewos B. Review on Molecular mechanism of first line antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobact.*, 2014; Dis 4(6): 174.
- Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine.*, 2006; 100: 1862-1870.

- Davies PDO, Yew WW, Ganguly D, Davidow AL, Reichman LB, Dheda K, Rook GA. Smoking and tuberculosis: the epidemiological association and pathogenesis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 2006: 100 (4): 291–298.
- Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, Molitor A, Pagès JM. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets.*, 2008: 9: 750–759.
- de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *The Journal of Infectious Diseases.*, 1999: 180: 1238-1244.
- de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*—review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2010: 4: e744.
- de Jong BC, Hill PC, Aiken A, Awine T, Antonio M, Adetifa IM, Jackson-Sillah DJ, Fox A, Deriemer K, Gagneux S, Borgdorff MW, McAdam KP, Corrah T, Small PM, Adegbola RA. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in the Gambia. *J. Infect. Dis.*, 2008: 198: 1037–1043
- De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martín C, Aínsa JA, Guglierame P, Riccardi G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med.*, 2002: 8:714–724.
- De Rossi E, Blokpoel MC, Cantoni R, Branzoni M, Riccardi G, Young DB, De Smet KA, Ciferri O. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, *tet(V)*, from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 1998 :42(8):1931-1937.
- Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I, Sola C, Zozio T, Rastogi N. SITVITWEBa publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.*, 2012: 12(4):755-66.
- Denkinger C. The TB diagnose pipeline. Cape Town, South Africa: 46th Union World Conference on Lung Health., 2015.

- Deretic V, Pagán-Ramos E, Zhang Y, Dhandayuthapani S, Via LE. The extreme sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to the front-line antituberculosis drug isoniazid. *Nat Biotechnol.*, 1996 :14(11):1557-1561.
- Deretic V, Philipp W, Dhandayuthapani S, Mudd MH, Curcic R, Garbe T, Heym B, Via LE, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol. Microbiol.*, 1995:17:889-900.
- Deretic, V., J. Song, and E. Pagan-Ramos. 1997. Loss of *oxyR* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.*, 1997:5:367-372.
- Dessen A, Quemard A, Blanchard JS, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.*, 1995: 267: 1638–1641.
- Dhandayuthapani S, Zhang Y, Mudd MH, Deretic V. Oxidative stress response and its role in sensitivity to isoniazid in mycobacteria: characterization and inducibility of *ahpC* by peroxides in *Mycobacterium smegmatis* and lack of expression in *M. aurum* and *M. tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 1996:178, 3641-3649.
- Dheda K, Shean K, Zumla A, Badri M, Streicher EM, Page-Shipp L, Willcox P, John MA, Reubenson G, Govindasamy D, Wong M, Padanilam X, Dziwiecki A, van Helden PD, Siwendu S, Jarand J, Menezes CN, Burns A, Victor T, Warren R, Grobusch MP, van der Walt M, Kvasnovsky C. Early treatment outcomes and HIV status of patients with extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa: a retrospective cohort study. *Lancet.*, 2010: 22: 1798-1807.
- Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This Official Statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was Adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2000: 161:1376–1395.
- Diallo AB, Kollo AI, Camara M, Lo S, Ossoga GW, Mbow M et al. Performance of GeneXpert MTB / RIF® in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in Dakar: 2010-2015. *Pan Afr Med J.*, 2016: 25:129.

- Dippenaar A, Parsons SDC, Sampson SL, van der Merwe RG, Drewe JA, Abdallah AM, Siame KK, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Pain A, Warren RM. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2015: 95, 682–688.
- Dixit R, Dave L. Primary nasal tuberculosis. *Lung India*. 2008: 25(2):102-103.
- Djelouadji Z, Arnold C, Gharbia S, Raoult D, Drancourt M: Multispacer sequence typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *PLoS ONE*, 2008: 3: e2433.
- Djelouadji Z, Henry M, Bachtarzi A, Foselle N, Raoult D, Drancourt M. Pyrosequencing identification of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing. *BMC Res Notes*, 2009: 2;2:239.
- Domenech P, Barry CE, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Microbiol*, 2001: 4:28–34.
- Dong H, Shi L, Zhao X, Sang B, Lv B, Liu Z, Wan K. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Tibetans in Tibet, China. *PLoS One*, 2012: 7 (3).
- Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *The Lancet Infectious Diseases*, 2004: 4: 584-592.
- Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *J Antimicrob Chemother*, 2018: 1;73(5):1138-1151.
- Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, Hall SL, Chakravorty S, Cirillo DM, Tukvadze N, Bablishvili N, Stevens W, Scott L, Rodrigues C, Kazi MI, Joloba M, Nakiyingi L, Nicol MP, Ghebrekristos Y, Anyango I, Murithi W, Dietze R, Lyrio Peres R, Skrahina A, Auchynka V, Chopra KK, Hanif M, Liu X, Yuan X, Boehme CC, Ellner JJ, Denkinger CM; study team. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*, 2018: 18(1):76-84.
- Douglass J, Steyn LM. A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis*, 1993: 167: 1505–1506.

- Drake TA, Hindler JA, Berlin OGW, Bruckner DA. Rapid identification of *Mycobacterium avium* Complex in culture using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, 1987: 25, 1442-1445.
- Drancourt M, Roux V, Dang LV, Tran-Hung L, Castex D, Chenal-Francois V, Ogata H, Fournier PE, Crubézy E, Raoult D. Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg Infect Dis.*, 2004: 10(9):1585-1592.
- Draper P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Frontiers of Biosciences.*, 1998: 3, 1253–1261.
- Dubnau E, Chan J, Raynaud C, Mohan VP, Laneelle MA, Yu K, Quemard A, Smith I, Daffé M. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.*, 2000: 36: 630–637.
- Dubos R., Dubos, J. The white plague. *Tuberculosis, man and society*. Little Brown and Co., Boston, 1953
- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The Resumption of Consumption—A Review on Tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2006: 101, 697-714.
- Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Williams BG. What is the limit to case detection under the DOTS strategy for tuberculosis control? *Tuberculosis (Edinb)*, 2003: 83: 35-43.
- ECDC, Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, 2020. Data 2018: 2020.
- Eckstein TM, Inamine JM, Lambert ML, Belisle JT: A genetic mechanism for deletion of the *ser2* gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol.*, 2000: 182(21):6177–6182.
- Eddabra R, Ait Benhassou H. Rapid molecular assays for detection of tuberculosis. *Pneumonia (Nathan)*, 2018 :25;10:4.
- Ei PW, Aung WW, Lee JS, Choi GE, Chang CL. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods. *J Korean Med Sci.*, 2016: (11): 1673–1683.
- Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med.*, 1990: 322: 178-183.
- Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takemura T, Takizawa T, Koike M, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma OP, Ando M. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph

- nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clinical Microbiology.*, 2002: 40(1): 198-204.
- Elbir H, Abdel-Muhsin AM, Babiker A. A. One-step DNA PCR-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex grown on Lowenstein-Jensen media. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2008: 78(2):316–317.
- Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:581–591.
- Escalante P, McKean-Cowdin R, Ramaswamy SV, Williams-Bouyer N, Teeter LD, Jones B, Graviss EA. Can mycobacterial *katG* genetic changes in isoniazid-resistant tuberculosis influence human disease features? *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2013;17:641–651.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) / WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2020 (data 2018).
- European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2014. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2014.
- Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, Hunt D, Tweddell A, Wood A, Anderson C, Hewinson RG, Smith NH, Hawkey PM, Sonnenberg P. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence of person-to-person transmission in the UK. *Lancet.*, 2007: 369:1270 –1276.
- Eybpoosh S, Haghdoost AA, Mostafavi E, Bahrapour A, Azadmanesh K, Zolala F. Molecular epidemiology of infectious diseases. *Electron Physician.*, 2017: 1;9(8):5149-5158.
- Fabre M, Koeck JL, Le Fleche P, Simon F, Herve V, Vergnaud G, et al. High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of “*Mycobacterium canettii*” strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of “*M. canettii*” *J Clin Microbiol.*, 2004: 42:3248–3255.
- Falkinham J.O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.*, 2009: 107, 356–367.
- Falkinham JO. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med.*, 2002: 23:529-551.

- Fennelly KP, Jones-López EC, Ayakaka I, Kim S, Menyha H, Kirenga B, Muchwa C, Joloba M, Dryden-Peterson S, Reilly N, Okwera A, Elliott AM, Smith PG, Mugerwa RD, Eisenach KD, Ellner JJ. Variability of infectious aerosols produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2012: 186(5):450-457.
- Fennelly KP, Jones-López EC. Quantity and Quality of Inhaled Dose Predicts Immunopathology in Tuberculosis. *Front Immunol.*, 2015: 29;6:313
- Fenner L, Egger M, Bodmer T, Altpeter E, Zwahlen M, Jatun K, Pfyffer GE, Borrell S, Dubuis O, Bruderer T, Siegrist HH, Furrer H, Calmy A, Fehr J, Stalder JM, Ninet B, Böttger EC, Gagneux S; Swiss HIV Cohort Study and the Swiss Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study Group. Effect of mutation and genetic Background on drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Ch.*, 2012: 56:3047–3053.
- Feuerriegel S, Köser CU, Niemann S. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Antimicrob Chemother.*, 2014: 69(5):1205-1210.
- Feuerriegel S, Koser CU, Richter E, Niemann S. *Mycobacterium canettii* is intrinsically resistant to both pyrazinamide and pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.*, 2013: 68:1439–1440
- Feuerriegel S, Oberhauser B, George AG, Dafaie F, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from a high-incidence setting. *BMC Microbiol.*, 2012:12:90.
- Feuerriegel S, Oberhauser B, George AG, Dafaie F, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from a high-incidence setting, *BMC Microbiol.*, 2012: 30;12:90.
- Filliol, I., Driscoll, J.R., Van Soolingen, D., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Valetudie, G., Anh, D.D., Barlow, R., Banerjee, D., Bifani, P.J., Brudey, K., Cataldi, A., Cooksey, R.C., Cousins, D.V., Dale, J.W., Dellagostin, O.A., Drobniewski, F., Engelmann, G., Ferdinand, S., Gascoyne-Binzi, D., Gordon, M., Gutierrez, M.C., Haas, W.H., Heersma, H., Kallenius, G., Kassa-Kelembho, E., Koivula, T., Ly, H.M., Makristathis, A., Mammina, C., Martin, G., Mostrom, P., Mokrousov, I., Narbonne, V., Narvskaya, O., Nastasi, A., Niobe-Eyangoh, S.N., Pape, J.W., Rasolofo-Razanamparany, V., Ridell, M., Rossetti, M.L., Stauffer, F., Suffys, P.N., Takiff, H.,

Texier-Maugein, J., Vincent, V., De Waard, J.H., Sola, C., Rastogi, N. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerging Infectious Diseases*, 2002: 8: 1347-1349.

Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valétudie G, Dang DA, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniewski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Kassa-Kelembho E, Ho ML, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Moström P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasolofo-Razanamparany V, Ridell M, Rossetti ML, Stauffer F, Suffys PN, Takiff H, Texier-Maugein J, Vincent V, de Waard JH, Sola C, Rastogi N. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003: 41: 1963-1970.

Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Böttger EC. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol*, 1993: 9(6):1239-1246.

Firdessa R, Berg S, Hailu E, Schelling E, Gumi B, Erenso G, Gadisa E, Kiros T, Habtamu M, Hussein J, Zinsstag J, Robertson BD, Ameni G, Lohan AJ, Loftus B, Comas I, Gagneux S, Tschopp R, Yamuah L, Hewinson G, Gordon SV, Young DB, Aseffa A. Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerg Infect Dis*, 2013: 9(3):460-463.

Fletcher HA, Snowden MA, Landry B, Rida W, Satti I, Harris SA, Matsumiya M, Tanner R, O'Shea MK, Dheenadhayalan V, Bogardus L, Stockdale L, Marsay L, Chomka A, Harrington-Kandt R, Manjaly-Thomas ZR, Naranbhai V, Stylianou E, Darboe F, Penn-Nicholson A, Nemes E, Hatherill M, Hussey G, Mahomed H, Tameris M, McClain JB, Evans TG, Hanekom WA, Scriba TJ, McShane H. T-cell activation is an immune correlate of risk in BCG vaccinated infants. *Nat. Commun.*, 2016: 7, 11290.

- Flores AR, Parsons LM, Pavelka MS, Jr. Genetic analysis of the beta-lactamases of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology*, 2005: 151: 521–532.
- Fomukong N, Beggs M, el Hajj H, Templeton G, Eisenach K, Cave MD. Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tuber Lung Dis.*, 1997: 78, 109-116.
- Forbes BA. Mycobacterial Taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology.*, 2017: 55(2), 380-383.
- Forbes M, Kuck NA, Peets EA. Effect of Ethambutol on Nucleic Acid Metabolism in *Mycobacterium Smegmatis* and Its Reversal by Polyamines and Divalent Cations. *Journal of Bacteriology.*, 1965: 89: 1299-1305.
- Forbes M, Kuck NA, Peets EA. Mode of action of ethambutol. *Journal of Bacteriology.*, 1962: 84: 1099-1103.
- Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, Johnston JC, Gardy J, Lipsitch M, Fortune SM. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet.*, 2013: 45(7):784-790.
- Forget EJ, Menzies D. Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. *Expert Opin Drug Saf.*, 2006: 5(2): p. 231.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Virulence.*, 2013: 4: 3-66.
- Fox HH. The chemical approach to the control of tuberculosis. *Science.*, 1952: 116:129–134.
- Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 1999: 3: Suppl 2:S231-S279.
- Frankel A, Penrose C, Emer J. Cutaneous tuberculosis: a practical case report and review for the dermatologist. *J Clin Aesthet Dermatol.*, 2009: 2:19-27.
- Fregnan GB, Smith DW. Description of various colony forms of mycobacteria. *J Bacteriol.*, 1962: 83(4):819–827.

- Frith J. History of tuberculosis. Part 1 - Phthisis, consumption and the white plague. *Journal of Military and Veterans' Health.*, 2014: 22(2):29-35.
- Fu LM, Fu-Liu CS. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis.*, 2002: 82, 85–90.
- Fu LM, Shinnick TM. Understanding the action of INH on a highly INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain using Genechips. *Tuberculosis.*, 2007:87, 63-70.
- Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Encisco A, Munoz S, Hopewell PC, Small PM, Pym AS. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.*, 2006:2:e61.
- Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2006: 21;103(8):2869-2873.
- Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannon BJM. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.*, 2006: 312:1944-1946.
- Gallego B, Sintchenko V, Jelfs P, Coiera E, Gilbert GL. Three-year longitudinal study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in a low prevalence population. *Pathology.*, 2010: 42(3):267-72.
- Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, Zeller K, Andrews J, Friedland G. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet.*, 2006: 368: 1575-1580.
- Gandhi NR, Shah NS, Andrews JR, Vella V, Moll AP, Scott M, Weissman D, Marra C, Lalloo UG, Friedland GH. Tugela Ferry Care and Research (TF CARES) Collaboration. HIV coinfection in multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis results in high early mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, 2010: 181: 80-86.
- Gao B, Gupta RS. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012: 76, 66–112.

- Garbe TR, Hibler NS, Deretic V. Isoniazid induces expression of the antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996: 40:1754-1756.
- Gardee Y, Dreyer AW, Koornhof HJ, Omar SV, da Silva P, Bhyat Z, Ismail NA. Evaluation of the GenoType MTBDRsl Version 2.0 Assay for Second-Line Drug Resistance Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in South Africa. *J Clin Microbiol.*, 2017 :55(3):791-800.
- Garg A, Srivastava S, Ayyagari A, Katoch VM, Dhole TN. *embB* gene mutations associated with ethambutol resistance in Indian strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current science.*, 2006: 91(11):1512.
- Geiss HK, Feldhues R, Neimann O, Nolte R, Reiker R. Landousy septicaemia (sepsis tuberculosa acutissima) due to *Mycobacterium microti* in an immunocompetent man. *Infection.*, 2005: 33:393–396.
- Geistlich M, Losick R, Turner JR, Rao RN. Characterization of a novel regulatory gene governing the expression of a polyketide synthase gene in *Streptomyces ambofaciens*. *Mol Microbiol.*, 1992:6(14):2019-2029.
- Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BM, Islam NM, Sarkar SN, Dasgupta S, Kirsebom LA. Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2009: 106:10781–10786.
- Gibson U, Heid C, Williams P. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 1996: 6:995.
- Gillespie S. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002: 46: 267–274.
- Giri A, Gupta S, Safi H, Narang A, Shrivastava K, Kumar Sharma N, Lingaraju S, Hanif M, Bhatnagar A, Menon B, Alland D, Varma-Basil M. Polymorphisms in Rv3806c (*ubiA*) and the upstream region of *embA* in relation to ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from North India. *Tuberculosis (Edinb).*, 2018:108:41-46.
- Gkaravela L, Papadimitriou-Olivgeris M, Foka A, Kolonitsiou F, Spiliopoulou A, Charokopos N, Voulgaridis A, Tsiamita M, Marangos M, Anastassiou ED, Spiliopoulou I. Combination of commercially available molecular assays and culture based methods in diagnosis of tuberculosis and drug resistant tuberculosis. *Braz J Microbiol.*, 2017: 48:785–790.

- Gkavarella L, Florou Z, Papadimitriou-Olivgeris M, Kontos F, Foka A, Vasdeki A, Kolonitsiou F, Charokopos N, Karkoulis K, Marangos M, Anastassiou E, Zerva L, Petinaki E, Spiliopoulou I. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains: a multicenter retrospective Greek study. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*, 2019: ISSN 2578-0190.
- Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.*, 2005;11: 1211–1217.
- Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerging Infectious Diseases*, 2002: 8: 843-849.
- Goodfellow M, Magee JG. Taxonomy of mycobacteria. In: Gangadharam PRJ, Jenkins PA, editors. *Mycobacteria I: Basic aspects*. New York: Chapman and Hall, 1998: p. 1-71.
- Gortazar C, Vicente J, Samper S, Garrido JM, Fernandez-De-Mera IG, Gavin P, Juste RA, Martin C, Acevedo P, De La Puente M, Hofle U. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet Res.*, 2005: 36:43–52.
- Goude R, Amin AG, Chatterjee D, Parish T. The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2009: 53(10):4138-4146.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ Jr, Winthrop K; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. American Thoracic Society Statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2007;175:367– 416.
- Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: Application for strain differentiation by a novel method. *Mol. Microbiol.*, 1993;10(5):1057-1065.

- Grosset J. The sterilizing value of rifampicin and pyrazinamide in experimental short-course chemotherapy. *Bull. Int. Union Tuberc.*, 1978; 53: 5–12.
- Guidry TV, Hunter RL, Actor JK. Mycobacterial glycolipid trehalose 6,6'-dimycolate-induced hypersensitive granulomas: contribution of CD4+ lymphocytes. *Microbiology (Reading)*., 2007; 153(Pt 10):3360-3369.
- Gunn-Moore DA, Jenkins PA, Lucke VM. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. *Vet Rec.*, 1996; 138:53–8.
- Guo H, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J. Med. Microbiol.*, 2006; 55: 1527–1531.
- Gupta AK, Katoch VM, Chauhan DS, Sharma R, Singh M, Venkatesan K, Sharma VD. Microarray analysis of efflux pump genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-tuberculous drugs. *Microb. Drug Resist.*, 2010; 16:21–28.
- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens.*, 2005 ;1(1): e5.
- Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2017; 41, 354–373.
- Haas WH, Schilke K, Brand J, Amthor B, Weyer K, Fourie PB, Bretzel, Sticht-Groh V, Bremer GH. Molecular Analysis of *katG* Gene Mutations in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997;41 (7): 1601-1603.
- Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CRE, Kidd M, Beyers N, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45 (5), 1483–1490.

- Hargreaves S, Lönnroth K, Nellums LB, Olaru ID, Nathavitharana RR, Norredam M, Friedland JS. Multidrug-resistant tuberculosis and migration to Europe. Review. Clin Microbiol Infect., 2017 :23(3):141-146.
- Hart PD, Sutherland I. BCG and vole bacillus vaccine in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. Br Med J., 1977: 2: 293-295.
- Hartmans S, de Bont JAM, Stackebrandt E. Chapter 1.1.18 - The genus *Mycobacterium*—nonmedical, in The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes, eds Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt. (Springer, New York), 2006: 889–918.
- Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, Stamler JS. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. Cell., 1996: 86:719-729.
- Haverkamp MH, Arend SM, Lindeboom JA, Hartwig NG, van Dissel JT. Nontuberculous mycobacterial infection in children: a 2-year prospective surveillance study in the Netherlands. Clin Infect Dis., 2004: 39:450-456.
- Hazbón MH, Bobadilla del Valle M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M, Colangeli R, Safi H, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, García-García L, Davidow A, Brimacombe M, León CI, Porras T, Bose M, Chaves F, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León A, Cave MD, Alland D. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. Antimicrob Agents Chemother., 2005: 49(9):3794-3802.
- Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, Garcia-Garcia L, Leon CI, Bose M, Chaves F, Murray M, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J, Cave MD, Ponce de Leon A, Alland D. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother., 2006: 50:2640–2649.
- Hazbón MH, Bobadilla del Valle M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M, Colangeli R, Safi H, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, García-García L, Davidow A, Brimacombe M, León CI, Porras T, Bose M, Chaves F, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J,

- Ponce de León A, Cave MD, Alland D. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: A novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005;49, 3794–3802
- He L, Wang X, Cui P, Jin J, Chen J, Zhang W, Zhang Y. *ubiA* (Rv3806c) encoding DPPR synthase involved in cell wall synthesis is associated with ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2015; 95: 149–154.
- Heemskerk D, Caws M, Marais B, Farrar J. *Tuberculosis in Adults and Children. Chapter 2 Pathogenesis*, London: Springer.2015.
- Heep M, Brandstätter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.*, 2001;39:107e10.
- Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2000; 44(4):1075-1077.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 1996; 6: 986–994.
- Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun.*, 1991; 59(8):2695-705.
- Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema AR, McAdam RA, Catty D, van Embden JD., Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis, *J Clin Microbiol.*, 1990 ;28(9):2051-2058.
- Herrera L, Valverde A, Saiz P, Sáez-Nieto JA, Portero JL, Jiménez MS. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines. *Int J Antimicrob Agents.*, 2004; 23: 572–576.
- Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov DA, Feldman MW, Gagneux S. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol.*, 2008;6: e311

- Herzog, H. History of tuberculosis. *Respiration*, 1998: 65: 5-15
- Hett E.C. and Rubin E.J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Rs Microbiol. Mol. Biol.* 2008: 72, 126-156.
- Heym B, Alzari PM, Honoré N, Cole ST. Missense mutations in the catalase peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 1995:15(2):235-245.
- Heym, B., Honore, N., Truffot-Pernot, C., Banerjee, A., Schurra, C., R., J.W., Jr, van Embden, J.D., Grosset, J.H., Cole, S.T. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of *tuberculosis*: a molecular study. *Lancet*, 1994: 344: 293-298.
- Heym, B., Saint-Joanis B., Cole S.T, The Molecular Basis of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Tubercle and Lung Disease*, 1999: 79(4): 267-271
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993: 11(9):1026-1030
- Hilleman D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the Genotype MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 2635-2640.
- Hillemann D, Kubica T, Rüsche-Gerdes S, Niemann S. Disequilibrium in distribution of resistance mutations among *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and non-Beijing strains isolated from patients in Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Mar;49(3):1229-1231.
- Hillemann D, Rüsche-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2009:47:1767-1772
- Hillemann, D., Richter E., Rusch-Gerdes S. "Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 Automated System for Recovery of Mycobacteria from 9,558 Extrapulmonary Specimens, Including Urine Samples", *Journal Of Clinical Microbiology*, 2006: 44(11): 4014-4017.
- Hlaing YM, Tongtawe P, Tapchaisri P, Thanongsaksrikul J, Thawornwan U, Archanachan B, Srimanote P. Mutations in Streptomycin Resistance Genes and Their Relationship to

- Streptomycin Resistance and Lineage of *Mycobacterium tuberculosis* Thai Isolates. *Tuberc Respir Dis* (Seoul). 2017; 80(2):159-168.
- Ho CK, Ho MH, Chong LY. Cutaneous *tuberculosis* in Hong Kong: an update. *Hong Kong Med J*. 2006 Aug; 12(4):272-7.
- Hoelzel AR. *Molecular Genetic Analysis of Populations. A practical approach*. Second Edition. Oxford University Press. 1998.
- Hoffner S, Angeby K, Sturegård E, Jönsson B, Johansson A, Sellin M, Werngren J. 2013. Proficiency of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide: the Swedish experience. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2013; 17:1486–1490.
- Holland, P.M., Abramson R.D., Watson R., and Gelfand, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88, 7276–7280.
- Hollo V, Kotila SM, Ködmön C, Zucs P, van der Werf MJ, The effect of migration within the European Union/European Economic Area on the distribution of *tuberculosis* , 2007 to 2013. *Euro Surveill*. 2016; 21(12).
- Homolka S, Post E, Oberhauser B, et al. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. *BMC Microbiol*. 2008; 8(1):103.
- Homolka, S., Niemann, S., Russell, D. G., Rohde, K. H. Functional genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. *PLoS Pathog*. 2010; 6, e1000988
- Hong, X., Hopfinger A. J. Molecular modeling and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell wall permeability. *Biomacromolecules*. 2004; 5:1066-77.
- Honore, N, Cole, S.T. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38(2), 238-322.
- Hood, L.E., Hunkapiller, M.W. and Smith, L.M. Automated DNA sequencing and analysis of the human genome. *Genomics* 1987; 1: 201–212.
- Horne DJ, Pinto LM, Arentz M, Lin SY, Desmond E, Flores LL, Steingart KR, Minion J. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug

- susceptibility testing methods for firstline and second-line antituberculosis drugs. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51: 393–401.
- Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, Lyons CR, Byrd TF. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* 2006; 152(Pt 6):1581–1590.
- Huang H, Scherman MS, D'Haese W, Vereecke D, Holsters M, Crick DC, McNeil MR. Identification and active expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding 5-phospho- α -D-ribose-1-diphosphate: decaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferase, the first enzyme committed to decaprenylphosphoryl-D-arabinose synthesis. *J Biol Chem.* 2005; 280(26):24539-43.
- Huang SJ, Wang XH, Liu ZD, Cao WL, Han Y, Ma AG, Xu SF. Vitamin D deficiency and the risk of tuberculosis: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016; 28;11:91-102.
- Huang W, Chen H, Kuo Y, Jou R. Performance assessment of the GenoType MTBDRplus test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2520–2524
- Huang WL, Chi TL, Wu MH, Jou R. Performance assessment of the GenoType MTBDRsl test and DNA sequencing for detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2011 ; 49(7):2502-8.
- Humblet MF, Boschirolu ML, Saegerman C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res.* 2009 ; 40(5):50.
- Hunter, R. L., Olsen M. R., Jagannath C., Actor J. K. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitory tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36:371-86, 148.
- Idigoras P, Beristain X, Iturzaeta A, Vicente D, Pérez-Trallero E. Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Löwenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 ; 9(5):350-354.

- Ilina EN, Shitikov EA, Ikryannikova LN, Alekseev DG, Kamashev DE, Malakhova MV, Parfenova TV, Afanas'ev MV, Ischenko DS, Bazaleev NA, Smirnova TG, Larionova EE, Chernousova LN, Beletsky AV, Mardanov AV, Ravin NV, Skryabin KG, Govorun VM. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistant strains from Russia. PLoS One. 2013; 8(2):e56577.
- Indrigo J., Hunter R.L. Jr, Actor J.K. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. Microbiology 2003; 149: 2049–2059.
- Ioannidis P, Papaventsis D, Karabela S, Nikolaou S, Panagi M, Raftopoulou E, Konstantinidou E, Marinou I, Kanavaki S. Cepheid GeneXpert MTB/RIF Assay for *Mycobacterium tuberculosis* Detection and Rifampin Resistance Identification in Patients with Substantial Clinical Indications of Tuberculosis and Smear-Negative Microscopy Results. J Clin Microb. 2011;49:3068-3070.
- Ioerger TR, Koo S, No EG, Chen X, Larsen MH, Jacobs WR Jr, Pillay M, Sturm AW, Sacchettini JC. Genome analysis of multi- and extensively-drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa. PLoS One. 2009; 5;4(11):e7778.
- Iram S, Zeenat A, Hussain S, Yusuf NW, Askam M. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay- report from a developing country. Pak J Med Sci. 2015;1:105–10.
- Isakova J, Sovkhozova N, Vinnikov D, Goncharova Z, Talaibekova E, Aldasheva N, Aldashev A. Mutations of *rpoB*, *katG*, *inhA* and *ahp* genes in rifampicin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyz Republic. BMC Microbiol. 2018; 22;18(1):22.
- Jadaun GP, Das R, Upadhyay P, Chauhan DS, Sharma VD, Katoch VM. Role of *embCAB* gene mutations in ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from India. Int J Antimicrob Agents. 2009 May;33(5):483-486.
- Jagielski T, Bakula Z, Roeske K, Kamiński M, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Bielecki J. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2014;69(9):2369-2375
- Jagielski T, Bakula Z, Roeske K, Kamiński M, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Bielecki J. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in

- multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates, J Antimicrob Chemother. 2014; 69(9):2369-2375.
- Jagielski T, Bakuła Z, Roeske K, Kamiński M, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Bielecki J. Mutation profiling for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(12):3214-3221.
- Jagielski T, Ignatowska H, Bakuła Z, Dziewit Ł, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Bielecki J. Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. PLoS One. 2014; 17;9(6):e100078.
- Jagielski T, Minias A, van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Żaczek A., Dziadek J. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2016; 29: 239-290.
- Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. Biomed Res Int. 2014:2014:645802.
- Jahans K, Palmer S, Inwald J, Brown J, Abayakoon S. Isolation of *Mycobacterium microti* from a male Charolais-Hereford cross. Vet Rec. 2004;155:373–374.
- Jain A, Mondal R, Srivastava S, Prasad R, Singh K, Ahuja RC, Novel mutations in emb B gene of ethambutol resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: a preliminary report, Indian J Med Res. 2008;128(5):634-639
- Jansen R, Embden J. D.A.v., Gaastra W, Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Molecular Microbiology, 2002; 43(6), 1565-1575.
- Jarlier, V. and Nikaido, H. Mycobacterial cell walls: structure and role in natural resistance to antibiotics. FEMS Microbiology Letters 1994; 123, 11–18.
- Jensen, K. A. "Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillentamen." Zentralb. Bakteriol Parasitenkd. infektionskr. hyg. Agt. I Orig., 1932: 125:222
- Jeong YJ, Lee KS. Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management. AJR Am J Roentgenol. 2008; 191: 834-844.

- Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the Escherichia coli rpoB gene that lead to rifampicin resistance. J Mol Biol 1988;202:45-58
- Jnawali HN, Hwang SC, Park YK, Kim H, Lee YS, Chung GT, Choe KH, Ryoo S. Characterization of mutations in multi- and extensive drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Republic of Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 76(2):187-96.
- Jnawali HN, Ryoo S, First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance, Tuberculosis- Current Issues in Diagnosis and Management, 2013;10: 163-171
- Jnawali HN, Yoo H, Ryoo S, Lee KJ, Kim BJ, Koh WJ, Kim CK, Kim HJ, Park YK. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea. World J Microbiol Biotechnol. 2013; 29(6):975-982.
- Johnson R, Jordaan AM, Pretorius L, Engelke E, van der Spuy G, Kewley C, Bosman M, van Helden PD, Warren R, Victor TC. Ethambutol resistance testing by mutation detection. Int J Tuberc Lung Dis. 2006 ;10(1):68-73
- Joloba, M.L., S. Bajaksouzian, M.R. Jacobs. Evaluation of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2000; 38(10):3834-3836.
- Jones, W.D., Jr, Greenberg, J. Modification of methods used in bacteriophage typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 1978; 7: 467-469.
- Jones-López EC, Namugga O, Mumbowa F, Ssebidandi M, Mbabazi O, Moine S, Mboowa G, Fox MP, Reilly N, Ayakaka I, Kim S, Okwera A, Joloba M, Fennelly KP. Cough aerosols of *Mycobacterium tuberculosis* predict new infection: a household contact study. Am J Respir Crit Care Med. 2013; 1;187(9):1007-1015.
- Jönssona B, Lönnemark E, Ridell M. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect Dis (Lond). 2015;47:231–236.
- Jordan TS, Davies PD. Clinical tuberculosis and treatment outcomes. Int J Tuberc Lung Dis. 2010. 14: 683-688.
- Joshi M.J. Tuberculosis chemotherapy in the 21st century: Back to the basics Lung India. 2011; 28(3): 193–200
- Juan Carlos Palomino and Anandi Martin, Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*, Antibiotics 2014, 3, 317-340

- Juréen, P.; Werngren, J.; Toro, J.C.; Hoffner, S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008: 52, 1852–1854
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. & van Embden, J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997: 35: 907-914.
- Kato-Maeda M, Metcalfe JZ, Flores L, Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. *Review Future Microbiol.* 2011 :6(2):203-16. doi: 10.2217/fmb.10.165.
- Kato-Maeda M, Shanley CA, Ackart D, Jarlsberg LG, Shang S, Obregon-Henao A, Harton M, Basaraba RJ, Henao-Tamayo M, Barrozo JC, Rose J, Kawamura LM, Coscolla M, Fofanov VY, Koshinsky H, Gagneux S, Hopewell PC, Ordway DJ, Orme IM. Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clinical and vaccine immunology: CVI.* 2012;19(8):1227–37
- Katsukawa C, Tamaru A, Miyata Y, Abe C, Makino M, Suzuki Y. Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Appl Microbiol* 1997: 83:634e40.
- Kaufmann, S.H. & Schaible, U.E. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiology.* 2005: 13: 469-475.
- Kazdaglis G, Molina-Moya B, Manika K, Ioannidis P, Papaventsis D, Vogiatzakis E, Panopoulou M, Melidou A, Domínguez J, Malisiovas N, Gioula Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in northern Greece. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2018 Jul-Aug;32(4):931-936.
- Kazdaglis G., Manika K., Ioannidis P., Papaventsis D., Vogiatzakis E., Papakala E., Panopoulou M., Galatas A., Melidou A., Kioumis I, Malisiovas N., Gioula G, Drug Susceptibility Pattern from Tuberculosis Patients in Region of Macedonia Greece, *Journal of Tuberculosis Research*, 2016: 4, 92-97.

- Kelley CL, Rouse DA, Morris SL. Analysis of *ahpC* gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41:2057–2058.
- Kempell KE, Ji YE, Estrada IC, Colston MJ, Cox RA. The nucleotide sequence of the promoter, 16S rRNA and spacer region of the ribosomal RNA operon of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with *Mycobacterium leprae* precursor rRNA. *J Gen Microbiol.* 1992; 138: 1717-1727
- Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine. *N Engl J Med.* 2012; 367: 931-936.
- Keshavjee, S., Farmer P.E. Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern Medicine, *N Engl J Med.* 2012 :367(10):931-6.
- Kiepiela P, Bishop KS, Smith AN et al. Genomic mutations in the *katG*, *inhA* and *ahpC* genes are useful for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kwazulu Natal, South Africa. *Tuber Lung Dis* 2000; 80: 47–55
- Kiers A, Klarenbeek A, Mendelts B, Van Soolingen D, Koeter G. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *International Journal of Lung Diseases.* 2008; 12, 1469–1473.
- Kiet VS, Lan NT, An DD, Dung NH, Hoa DV, van Vinh Chau N, et al. Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second- line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2010;48:2934-2939
- Kigozi E, Kasule GW, Musisi K, Lukoye D, Kyobe S, Katabazi FA, Wampande EM, Joloba ML, Kateete DP. Prevalence and patterns of rifampicin and isoniazid resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Uganda. *PLoS One.* 2018; 30;13(5):e0198091.
- Kim BJ, Kim BR, Lee SY, Kook YH, Kim BJ. Rough colony morphology of *Mycobacterium massiliense* Type II genotype is due to the deletion of glycopeptidolipid locus within its genome. *BMC Genomics.* 2013; 14:890.
- Kim JH, Kim YJ, Ki CS, Kim JY, Lee NY. Evaluation of Cobas TaqMan MTB PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2011;49:173–176

- Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur. Respir. J.* 2005; 25:564–569.
- Kim SY, Park YJ, Kim WI, Lee SH, Ludgerus Chang C, Kang SJ, Kang CS. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47(3):497-502.
- Kim, D.H., Kim, H.J., Park, S.K., Kong, S.J., Kim, Y.S., Kim, T.H., Kim, E.K., Lee, K.M., Lee, S.S., Park, J.S., Koh, W.J., Lee, C.H., Kim, J.Y. & Shim, T.S. (2008). Treatment outcomes and long-term survival in patients with extensively drug-resistant tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2008; 178: 1075-1082.
- Konno K., Feldman F.M., McDermont W. 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of the tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1967; 95: 461–469.
- Köser CU, Bryant JM, Becq J, Török ME, Ellington MJ, Marti-Renom MA, et al. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *N Engl J Med* 2013;369:290-292
- Kraus, G., Cleary, T., Miller, N., Seivright, R., Young, A. K., Spruill, G., & Hnatyszyn, H.J. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Molecular and cellular probes.* 2001; 15(6), 375-383
- Kremer K, Au BK, Yip PC, Skuce R, Supply P, Kam KM, van Soolingen D. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43(1):314-320
- Kremer K, Van Soolingen D, Van Embden J, Hughes S, Inwald J, Hewinson G. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2793–2794.
- Kremer L, Douglas JD, Baulard AR, Morehouse C, Guy MR, Alland D, Dover LG, Lakey JH, Jacobs WR Jr, Brennan PJ, Minnikin DE, Besra GS. Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2000; 275:16857–16864. 71.
- Kremer L, Nampoothiri KM, Lesjean S, Dover LG, Graham S, Betts J, Brennan PJ, Minnikin DE, Loch C, Besra GS. Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and

- malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J Biol Chem* 2001: 276:27967–27974
- Kremer L., Besra G.S. A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In: Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Eds. Cole S.T., Eisenach K.D., McMurray D.N., Jacobs W.R., Jr. Washington, DC: American Society for Microbiology Press Press, 2005: 287–305.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakrus, M.A., Musser, J.M. van Embden, J.D., Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999: 37, 2607-18.
- Kruuner, A., Pehme, L., Ghebremichael, S., Koivula, T., Hoffner, S.E., Mikelsaar, M. Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Infectious Diseases*, 2002: 35: 146-155
- Kurepina, N.E., Sreevatsan, S., Plikaytis, B.B., Bifani, P.J., Connell, N.D., Donnelly, R.J., van Sooligen, D., Musser, J.M., Kreiswirth, B.N. Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis*: non-random integration in the dnaA-dnaN region. *Tubercle and Lung Disease*, 1998: 79: 31-42.,
- Kwara, A., Schiro, R., Cowan, L.S., Hyslop, N.E., Wiser, M.F., Roahen Harrison, S., Kissinger, P., Diem, L., Crawford, J.T. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003: 41: 2683-2685.
- Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology* 2015;47:199-210
- Lacoma A, Molina-Moya B, Prat C, Pimkina E, Diaz J, Dudnyk A, et al. Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* second-line drugs and ethambutol resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83:263–269
- Laloo UG, Ambaram A. New antituberculous drugs in development. *Curr HIV/AIDS Rep* 2010;7: 143-151.

- Laszlo, A., Rahman M., Espinal M., Raviglione M. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2002; 6:748-756
- Lavender C, Globan M, Sievers A et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4068–4074
- Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet* 2011; 378: 57-72.
- Lawn SD. Advances in Diagnostic Assays for Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5(12):a017806
- Le Fleche P, Fabre M, Denoeud F, Koeck JL, Vergnaud G. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiol.* 2002; 2: 37.
- Lee AS, Lim IH, Tang LL, Telenti A, Wong SY. Contribution of kasA analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(8):2087-2089
- Lee AS, Othman SN, Ho YM, et al. Novel mutations within the embB gene in ethambutol susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4447–4449.
- Lee AS, Teo AS, Wong SY. Novel mutations in ndh in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(7):2157-2159.
- Lee HR, Kim SY, Chang HE, Song SH, Lee HS, Park KU, Song J, Kim EC. Novel multiplex PCR using dual-priming oligonucleotides for detection and discrimination of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and *M. bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 2010;48:4612-4.
- Lee JY. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2015; 78(2):47-55.
- Lee MR, Chung KP, Wang HC, Lin CB, Yu CJ, Lee JJ, Huseh PR. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Med Microbiol.* 2013; 62:1160–1164

- Lee R.E., Li W., Chatterjee D., Lee R.E. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed. *Glycobiology*. 2005; 15: 139–151
- Lee SH. Tuberculosis Infection and Latent Tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016; 79(4):201-206.
- Lee, A. S, Othman, S. N, Ho, Y. M, Wong, S. Y. Novel mutations within the embB gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(11), 4447-9.,
- Lei B., Wei C.J., Tu S.C. Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of inhA inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 2520–2526
- Lemaitre N, Armand S, Vachee A, Capilliez O, Dumoulin C, Courcol RJ. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified M. tuberculosis direct test for detection of M. tuberculosis in pulmonary and nonpulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42:4307–4309.
- Lempens P, Meehan CJ, Vandelannoote K, Fissette K, de Rijk P, Van Deun A, Rigouts L, de Jong BC. Isoniazid resistance levels of *Mycobacterium tuberculosis* can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. *Sci Rep*. 2018; 19;8(1):3246.
- Leung CC, Rieder HL, Lange C, Yew WW. Treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*: update 2010. *Eur Respir J*. 2011; 37(3):690- 711.
- Leung E, Minion J, Benedetti A, Pai M, Menzies D. Microcolony culture techniques for tuberculosis diagnosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16: 16-23,
- Leung ET, Ho PL, Yuen KY, Woo WL, Lam TH, Kao RY, Seto WH, Yam WC. Molecular characterization of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a novel mutation in inhA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 ;50(3):1075-8.
- Leung, E., Minion J., Benedetti A., Pai M., Menzies D. “Microcolony culture techniques for tuberculosis diagnosis: a systematic review.” *Int J Tuberc Lung Dis*, 2012; 16: 16-23

- Li GL, Zhao DF, Xie T, Ju HF, Mu C, Zhao H, Wang XX. Molecular Characterization of Drug-Resistant Beijing Family Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Tianjin, China, Biomed Environ Sci. 2010; 23(3):188-193
- Li W, Chomel BB, Maruyama S, Guptil L, Sander A, Raoult D, Fournier PE. Multispacer typing to study the genotypic distribution of Bartonella henselae populations. J Clin Microbiol 2006;44: 2499–2506
- Li X.Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs. 2004; 64: 159-204.,
- Li X.Z., Zhang L., Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 2415–2423.
- Ling DI , Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. Eur Respir J 2008; 32: 1165–1174.
- Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy. Expert Rev. Respir. Med 2008; 2:583–588.
- Lingaraju S, Rigouts L, Gupta A, Lee J, Umubyeyi AN, Davidow AL, et al. Geographic differences in the contribution of ubiA mutations to high-Level ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2016;60(7):4101–5
- Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(6):620-626.
- Liu J, Rosenberg EY, Nikaido H. Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(24):11254–11258.
- Loddenkemper R, Lipman M, Zumla A. Clinical Aspects of Adult Tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015; 6(1):a017848.
- Loeffler SH, de Lisle GW, Neill MA, Collins DM, Price-Carter M, Paterson B, Crews KB. The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: epidemiologic factors and DNA strain typing. J Wildl Dis. 2014 Apr;50(2):180-187.
- Lombardi G, Di Gregori V, Girometti N, Tadolini M, Bisognin F, Dal Monte P. Diagnosis of smear-negative tuberculosis is greatly improved by Xpert MTB/RIF. PLoS One. 2017;12(4):e0176186

- Long E. R. The nutrition of acid-fast bacteria. *Am. Rev. Tuberc.* 1922: 6: 642–648.
- Long R, Ellis E. Tuberculosis elimination in Canada: Truce or victory? *CMAJ.* 2015 Nov 3;187(16):1191-1192.
- Lopez, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitia, C., Ritacco, V., Barrera, L., Kremer, K., Hernandez-Pando, R., Huygen, K. & van Soolingen, D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology*, 2003: 133: 30-37.
- Louw G.E., Warren R.M., van Pittius N.C., McEvoy C.R. , Van Helden P.D., Victor T.C. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009: 53: 3181–3189
- Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, McEvoy CR, Van Helden PD, Victor TC. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009: 53:3181–3189
- Lowenstein, E. “Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch auf Malachitgrün Einährboden.” *Ann. Inst. Pasteur.* 1933: 50:161.
- Lowenstein, E. “Die Zachtung der Tuberkelbazillen aus dem stramenden Blute.” *Zentralb. Bakteriol Parasitenkd. infektionskr. hyg. Abt. I orig.*, 1931: 120:127.
- Lu PL, Yang YC, Huang SC, Jenh YS, Lin YC, Huang HH, Chang TC. Evaluation of the Bactec MGIT 960 system in combination with the MGIT TBc identification test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 2011 : 49(6):2290-2.
- Luiz Rdos S, Suffys P, Barroso EC, Kerr LR, Duarte CR, Freitas MV, Mota RM, Frota CC. Genotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(3):338-45.
- Luo T, Zhao M, Li X, Xu P, Gui X, Pickerill S, DeRiemer K, Mei J, Gao Q. Selection of mutations to detect multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010: 54(3):1075-1081.

- Lutze-Wallace C, Turcotte C, Glover G, Cousins D, Bell J, Berlie-Surujoballi G, Barbeau Y, Randall G. Isolation of a *Mycobacterium* microti-like organism from a rock hyrax (*Procavia capensis*) in a Canadian zoo. *Can Vet J.* 2006 Oct;47(10):1011-1013.
- Machado D, Perdigão J, Ramos J, Couto I, Portugal I, Ritter C, Boettger EC, Viveiros M. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1728–1732
- Machado, D., Couto, I., Perdigao, J.o., Rodrigues, L., Portugal, I., Baptista, P., Veigas, B., Amaral, L., Viveiros, M., Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2012: 7, e34538
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker K., Brock Biology of Microorganisms. Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, 10th edition, 2003: 1019
- Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, Sloutsky A, Washabaugh G, Mazurek G, Ridderhof J. Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J. Clin. Microbiol.* 2002: 40:3976 –3979.
- Madsen CT, Jakobsen L, Buriánková K, Doucet-Populaire F, Pernodet JL, Douthwaite S. Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2005: 25;280(47):38942-38947.
- Makhado NA, Matabane E, Faccin M, Pinçon C, Jouet A, Boutachkourt F, Goeminne L, Gaudin C, Maphalala G, Beckert P, Niemann S, Delvenne JC, Delmée M, Razwiedani L, Nchabeleng M, Supply P, de Jong BC, André E. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa undetected by WHO-endorsed commercial tests: an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2018 Oct 17. pii: S1473-3099(18)30496-1. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30496-1.
- Mäkinen J, Marjamäki M, Haanperä-Heikkinen M, Marttila H, Endourova LB, Presnova SE, Mathys V, Bifani P, Ruohonen R, Viljanen MK, Soini H. Extremely high prevalence of multidrug resistant tuberculosis in Murmansk, Russia: a population-based study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(9):1119-1126.

- Malléa M., Chevalier J., Bornet C., Eyraud A., Davin-Regli A., Bollet C., Pagès J.M. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* 1998;14: 3003–3009.
- Maltezou HC, Spyridis P, Kafetzis DA. Extra-pulmonary tuberculosis in children. *Arch Dis Child* 2000; 83: 342–346.
- Manca, C., Tsenova, L., Freeman, S., Barczak, A.K., Tovey, M., Murray, P.J., Barry, C., Kaplan, G. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2005; 25: 694-701.
- Manika, K., Kotoulas S.C., Papadaki E., Kyreltsi P., Sionidou M., Kontakiotis T., Kioumis I. Tuberculosis treatment outcome in Thessaloniki, Greece - a single center study. 2019: 23(4):154-159.
- Manson AL, Abeel T, Galagan JE, Sundaramurthi JC, Salazar A, Gehrman T, Shanmugam SK, Palaniyandi K, Narayanan S, Swaminathan S, Earl AM. *Mycobacterium tuberculosis* whole genome sequences from Southern India suggest novel resistance mechanisms and the need for region-specific diagnostics. *Clin Infect Dis* 2017; 64: 1494–501
- Manten, A., Van Wijngaarden L.J. Development of drug resistance to rifampicin. *Chemotherapy* 1969; 14:93-100.,
- Marahatta S, Gautam S, Dhital S, Pote N, Jha A, Mahoto R, et al. katG (SER 315 THR) Gene Mutation in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Kathmandu University Medical Journal*. 2012;9(1):19–23
- Marais Bj, Gie RP, Schaaf HS et al. the spectrum of disease in children treated for tuberculosis in a highly endemic area. *Int J tuberc Lung Dis* 2006; 10:732-738.
- Mardassi, H., Namouchi, A., Haltiti, R., Zarrouk, M., Mhenni, B., Karboul, A., Khabouchi, N., Gey van Pittius, N.C., Streicher, E.M., Rauzier, J., Gicquel, B., Dellagi, K. Tuberculosis due to resistant Haarlem strain, Tunisia. *Emerging Infectious Diseases*, 2005; 6: 957-961.
- Mariam, SH, Identification and survival studies of *Mycobacterium tuberculosis* within Laboratory-Fermented bovine milk, *BMC Res Notes*. 2014; 7: 175.

- Marrakchi H., Laneelle G., Quemard A. 2000. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology*. 2000: 146: 289–296.
- Martinez, M., Garcia de Viedma, D., Alonso, M., Andres, S., Bouza, E., Cabezas, T., Cabeza, I., Reyes, A., Sanchez-Yebra, W., Rodriguez, M., Sanchez, M.I., Rogado, M.C., Fernandez, R., Penafiel, T., Martinez, J., Barroso, P., Lucerna, M.A., Diez, L.F., Gutierrez, C. Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006: 44: 2967-2969.
- Marttila HJ, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV, Viljanen MK. A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 :42(9):2443-2445.
- Master SS, Springer B, Sander P, Boettger EC, Deretic V, Timmins GS. Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of ahpC in resistance to peroxy nitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology* 148(Pt 10):3139-3144. ,
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology
- Mazars, E., Lesjean, S., Banuls, A.L., Gilbert, M., Vincent, V., Gicquel, B., Tibayrenc, M., Locht, C., Supply, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001: 98: 1901-1906.
- McAdam RA, Hermans PW, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Embden JD, Dale JW. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family, *Molecular Microbiology*, *Mol Microbiol*. 1990 :4(9):1607-1613
- McCammon MT, Gillette JS, Thomas DP, Ramaswamy SV, Graviss EA, Kreiswirth BN, Vijg J, Quitugua TN. Detection of rpoB mutations associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using denaturing gradient gel electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005: 49:2200–2209.
- McDermott W, Tompsett R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. *Am Rev Tuberc* 1954: 70: 748–754.

- Mcdermott, W, Tompsett, R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acid-ic environment in vitro. American Review of Tuberculosis. 1954: 70(4), 748-54)
- McHugh, T.D., Gillespie, S.H. Nonrandom association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis*: implications for molecular epidemiological studies. J Clin Microbiol 1998: 36, 1410-1413,
- McKinney, J.D. In vivo veritas: the search for TB drug targets goes live. Nat Med, 2000: 6(12): p. 1330-1333.
- Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, Crane DD, Musser JM, Barry CE, 3rd. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. Science 1998: 280:1607–1610.
- Medical Research Council, The prevention of streptomycin resistance by combined chemotherapy. BMJ. 1952: 1157-1162
- MedicalResearch Council, Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. A Medical Research Council investigation. Br. Med. J. 1948: 2, 769–782.
- Meftahi N, Namouchi A, Mhenni B, Brandis G, Hughes D, Mardassi H. Evidence for the critical role of a secondary site rpoB mutation in the compensatory evolution and successful transmission of an MDR tuberculosis outbreak strain. J Antimicrob Chemoth 2016:71:324–32.
- Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Böttger EC. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1996: 40: 2452–2454.
- Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Böttger EC. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 1996: 40: 2452–2454.
- Menardo F, Duchêne S, Brites D, Gagneux S. The molecular clock of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2019 :12;15(9):e1008067.
- Mendez, M.P., Landon, M.E., McCloud, M.K., Davidson, P., Christensen, P.J. Co-infection with pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerging Infectious Diseases, 2009: 15: 578-580.

- Merker M, Blin C, Mona S et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet* 2015: 47:242–249.
- Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*. In: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. Washington, DC: ASM Press; 1999: pp. 399–437.
- Middlebrook, G. Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc.* 1954 :69(3):471-2.
- Middlebrook, G. Studies on virulence of tubercle bacilli *Bull N Y Acad Med.* 1950:26:498-506.
- Miesel L, Weisbrod TR, Marcinkeviciene JA, Bittman R, Jacobs WR Jr. NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 1998 :180(9):2459-2467.
- Migliori, G.B., Lange, C., Girardi, E., Centis, R., Besozzi, G., Kliiman, K., Ortmann, J., Matteelli, A., Spanevello, A. & Cirillo, D.M. Extensively drug-resistant tuberculosis is worse than multidrug-resistant tuberculosis: different methodology and settings, same results. *Clinical Infectious Diseases*, 2008: 46: 958-959.
- Mikusová K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 : 39(11):2484-2489
- Millán-Lou MI, Alonso H, Gavín P, Hernández-Febles M, Campos-Herrero MI, Copado R, Cañas F, Kremer K, Caminero JA, Martín C, Samper S. Rapid test for identification of a highly transmissible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain of sub-Saharan origin. *J Clin Microbiol* 2012: 50(2): 516-518.
- Miller, N., Cleary, T., Kraus, G., Young, A. K., Spruill, G., Hnatyszyn, H. J. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smearpositive respiratory specimens and BacT/ALERTMP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2002: 40(11): 4143–4147.
- Miltgen J, Morillon M, Koeck JL, Varnerot A, Briant JF, Nguyen G, Verrot D, Bonnet D, Vincent V. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp *canetti*. *Emerg Infect Dis.* 2002 Nov;8(11):1350-2.
- Minnikin, D. E., Minnikin S. M., Goodfellow M., Stanford J. L. The mycolic acids of *Mycobacterium chelonae*. *J Gen Microbiol.* 1982: 128:817-822.

- Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniewski F, Rodionova Y, Bakonyte D, Stakenas P, Pimkina E, Augustynowicz-Kopeć E, Degano M, Ambrosi A, Hoffner S, Mansjö M, Werngren J, Rüsç-Gerdes S, Niemann S, Cirillo DM. *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide Resistance Determinants: a Multicenter Study, MBio. 2014;21;5(5):e01819-14.
- Mitchison D.A., Selkon J.B. The bactericidal activities of antituberculous drugs. Am. Rev. Tuberc. 1956; 74: 109–116.
- Mitchison, D. A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. Tubercle 1985; 66(3), 219-225
- Mitchison, D.A. Basic mechanisms of chemotherapy. Chest 1979; 76 Suppl 6: 771–781
- Mizrahi V, Andersen SJ. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? Mol Microbiol 1998;29:1331-9,
- Moazed D., Noller H.F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. Nature 1987; 327: 389–394,
- Moazed D., Noller H.F. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. Nature. 1987; 327: 389–394
- Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Tuber Lung Dis 1996, 77:103–108.
- Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1417–1424
- Mokrousov, I, Otten, T, Vyshnevskiy, B, & Narvskaya, O. Detection of embB306 mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40(10), 3810-3813
- Monteserin J, Camacho M, Barrera L, Palomino JC, Ritacco V, Martin A., Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in patients at risk of drug resistance in Bolivia. Infect Genet Evol. 2013; 17:195-201.

- Morgan M. A., Horstmeier C. D., DeYoung D. R., Robers G. D. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1983: 18(2): 384–388.
- Morris RP, Nguyen L, Gatfield J, Visconti K, Nguyen K, Schnappinger D, Ehrt S, Liu Y, Heifets L, Pieters J, Schoolnik G, Thompson CJ. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 :23;102(34):12200-5
- Moser I, Prodingler WM, Hotzel H, Greenwald R, Lyashchenko KP, Bakker D, Gomis D, Seidler T, Ellenberger C, Hetzel U, Wuennemann K, Moisson P (2008): *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Veterinary Microbiology.* 2008: 127, 399–406
- Moussatova, A., Kandt C., O'Mara M. L., Tieleman D. P. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 2008: 1778:1757-1771.
- Muller B, Streicher EM, Hoek KG, Tait M, Trollip A, Bosman ME, Coetzee GJ, Chabula-Nxiweni EM, Hoosain E, Gey van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM. *inhA* promoter mutations: a gateway to extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa? *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:344–351
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986: 51: 263-73
- Mullis KB. “The unusual origin of the polymerase chain reaction.” *Scientific American.* 1990; 4: 56-65”
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987: 155:335–350.
- Munoz FM, Starke JR. Tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*).In: Nelson Textbook of Pediatrics. 17th Ed. Edited by Behrman, Kliegman, Jenson. Saunders 2004.: pp 958-968.
- Murase Y, Mitari S, Sugawara I, Kato S, Maeda S. Promising loci of variable number of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 2008: 57: 873–880.

- Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 1988: (10):2120-2123
- Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JD. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 1996 :173(1):196-202.
- Musser, J. M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995: 8(4): 496-514
- Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, Barry PM, Brozek JL, Cattamanchi A, Chaisson LH, Chaisson RE, Daley CL, Grzemska M, Higashi JM, Ho CS, Hopewell PC, Keshavjee SA, Lienhardt C, Menzies R, Merrifield C, Narita M, O'Brien R, Peloquin CA, Raftery A, Saukkonen J, Schaaf HS, Sotgiu G, Starke JR, Migliori GB, Vernon A. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2016: 1;63(7):e147-e195.
- Nair J, Rouse DA, Bai GH, Morris SL. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 1993: 10(3):521-527.
- Nancimae, M., Cleary T., Kraus G., Young A.K., Spruill G., James Hnatyszyn H. "Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Acid-Fast bacillus Smear-Positive respiratory Specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using Florogenic probes and Real-Time PCR". *JCM* 2002:4143-4147
- Nanda KD, Mehta A, Marwaha M, Kalra M, Nanda J. A disguised tuberculosis in oral buccal mucosa. *Dent Res J (Isfahan).* 2011 Summer;8(3):154-159.
- Naveen G, Peerapur BV. Comparison of the Lowenstein-Jensen Medium, the Middlebrook 7H10 Medium and MB/BacT for the Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) from Clinical Specimens. *J Clin Diagn Res.* 2016: (10):1704-1709.

- Neonakis, I.K., Gitti Z, Baritaki M, Kourbeti IS, Baritaki S, Petinaki E, Maraki S, Krambovitis E, Spandidos DA Resistance status of *Mycobacterium tuberculosis* on the island of Crete, Greece. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007 : 26(8):607-9.
- Newton GL, Arnold K, Price MS, Sherrill C, Delcardayre SB, Aharonowitz Y, Cohen G, Davies J, Fahey RC, Davis C. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. J. Bacteriol. 1999:178:1990-1995
- Newton GL, Av-Gay Y, Fahey RC, A novel mycothiol-dependent detoxification pathway in mycobacteria involving mycothiol S-conjugate amidase. Biochemistry. 2000: 39(35):10739-10746
- Newton GL, Buchmeier N, Fahey RC. Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2008:72:471-494.
- Newton GL, Fahey RC Mycothiol biochemistry. Arch. Microbiol. 2002:178:388-39
- Newton SM, Smith RJ, Wilkinson KA, Nicol MP, Garton NJ, Staples KJ, Stewart GR, Wain JR, Martineau AR, Fandrich S, Smallie T, Foxwell B, Al-Obaidi A, Shafi J, Rajakumar K, Kampmann B, Andrew PW, Ziegler-Heitbrock L, Barer MR, Wilkinson RJ. A deletion defining a common Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* associates with immune subversion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 :17;103(42):15594-15598.
- Neyrolles O, Hernandez-Pando R, Pietri-Rouxel F, Fornès P, Tailleux L, Payán JAB, Pivert E, Bordat Y, Aguilar D, Prévost MC, Petit C, Gicquel B. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? PLoS ONE. 2006: 1: e43
- Ng VH, Cox JS, Sousa AO, MacMicking JD, McKinney JD. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. Mol Microbiol 2004: 52:1291-1302
- Nguyen VA, Choisy M, Nguyen DH, Tran TH, Pham KL, Thi Dinh PT, Philippe J, Nguyen TS, Ho ML, Van Tran S, Bañuls AL, Dang DA. High Prevalence of Beijing and EAI4-VNM Genotypes among *M. tuberculosis* Isolates in Northern Vietnam: Sampling Effect, Rural and Urban Disparities. PLoS One. 2012:7(9):e45553
- Nhu NT, Lan NT, Phuong NT, Chau Nv, Farrar J, Caws M. Association of streptomycin resistance mutations with level of drug resistance and *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Int J Tuberc Lung Dis. 2012 : 16(4):527-531.

- Nicas M, Nazaroff WW, Hubbard A. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. *J Occup Environ Hyg.* 2005 Mar;2(3):143-154.
- Niederweis M. Mycobacterial porins - new channel proteins in unique outer membranes. *Mol. Microbiol.* 2003; 49: 1167–1177.
- Nikaido H. 2001 Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12: 215–223.
- Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78: 119– 146
- Nikolayevskyy V, Kranzer K, Niemann S, Drobniewski F. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: a systematic review. *Tuberculosis.* 2016;98:77–85
- Nimmo C, Doyle R, Burgess C, Williams R, Gorton R, McHugh TD, Brown M, Morris-Jones S, Booth H, Breuer J. Rapid identification of a *Mycobacterium tuberculosis* full genetic drug resistance profile through whole genome sequencing directly from sputum. *Int J Infect Dis.* 2017 :62:44-46.
- Noll H, Bloch H, Asselineau J, Lederer E. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta.* 1956; 20: 299-309.
- Nolte FS, Metchock B. Mycobacterium. In *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Edition American Society for Microbiology 1995: p. 400–437.
- North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:599-623.
- Nusrath Unissa A, Hanna LE. Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: Rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era. *Tuberculosis (Edinb).* 2017 :105:96-107.
- Odone A, Tillmann T, Sandgren A, Williams G, Rechel B, Ingleby D, Noori T, Mladovsky P, McKee M. Tuberculosis among migrant populations in the European Union and the European Economic Area. *Eur J Public Health.* 2015; 25(3):506-512.
- Oevermann A, Pfyffer GE, Zanolari P, Meylan M, Robert N. Generalized tuberculosis in llamas (*Lama glama*) due to *Mycobacterium microti*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1818–1821
- of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:658–85

- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 2008 :190(11):4050-60
- Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between RIF MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996: 40:1053–1056
- Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y, Ochi K, Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol.* 2007: 63(4):1096-106.
- Oliveira JS, Pereira JH, Canduri F, Rodrigues NC, de Souza ON, de Azevedo WF Jr, Basso LA, Santos DS. Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol.* 2006: 359, 646-66.
- O'Neill MB, Shockey A, Zarley A, Aylward W, Eldholm V, Kitchen A, Pepperell CS. Lineage specific histories of *Mycobacterium tuberculosis* dispersal in Africa and Eurasia. *Mol Ecol.* 2019 :28(13):3241-3256.
- Ordway DJ, Shang S, Henao-Tamayo M, Obregon-Henao A, Nold L, Caraway M, Shanley CA, Basaraba RJ, Duncan CG, Orme IM. *Mycobacterium bovis* BCG-mediated protection against W-Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis* is diminished concomitant with the emergence of regulatory T cells. *Clinical and vaccine immunology: CVI.* 2011: 18 (9):1527–35.
- O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1995: 76 Suppl 1:1-46
- O'Sullivan CE, Miller DR, Schneider PS, Roberts GD. Evaluation of gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test by using respiratory and non respiratory specimens in a tertiary care centerLaboratory. *J Clin Microbiol.* 2002:40(5):1723–1727.
- Ottmani SE, Uplekar MW. Gender and TB: Pointers from routine records and reports. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008:12(7):827–828.
- Out AA. Is the directly observed therapy short course (DOTS) an effective strategy for tuberculosis control in a developing country? *Asian Pac J Trop Dis.* 2013: 3(3): 227–231.

- Ozkutuk N, Surucüoglu S. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in an intermediate-prevalence setting. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48(2):223–32
- Pagan-Ramos E., Master S.S., Pritchett C.L., Reimschuessel R., Trucksis M., Timmins G.S., Deretic V. Molecular and physiological effects of mycobacterial *oxyR* inactivation. *J. Bacteriol.* 2006; 79: 2674–2680
- Pagès J.M., Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1794: 826–833.
- Pai M, Flores LL, Pai N, Hubbard A, Riley LW, Colford JM Jr. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:633–633
- Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. History. *Tuberculosis 2007, From basic science to patient care.* Textbook.com. First Edition.2007.
- Palomino JC, Martin A, Von Groll A, Portaels F. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 2008 :75(2):161-166.
- Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics (Basel).*2014: 3: 317–340
- Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(2):103–111
- Pandey B, Grover S, Goyal S, Jamal S, Singh A, Kaur J, Grover A. Novel missense mutations in *gidB* gene associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: insights from molecular dynamics. *J Biomol Struct Dyn.* 2018 : 4:1-16.
- Pandey B, Grover S, Tyagi C, Goyal S, Jamal S, Singh A, Kaur J, Grover A. Molecular principles behind pyrazinamide resistance due to mutations in *panD* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene.* 2016 : 25; 581(1):31-42
- Pandey S, Congdon J, McInnes B, Pop A, Coulter C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay on extrapulmonary and respiratory samples other than sputum: a low burden country experience. *Pathol.* 2017;49:70-4,

- Pang Y, Song Y, Xia H, Zhou Y, Zhao B, Zhao Y. Risk factors and clinical phenotypes of Beijing genotype strains in tuberculosis patients in China. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12:354.
- Pang Y, Zhou Y, Zhao B, Liu G, Jiang G, Xia H, Song Y, Shang Y, Wang S, Zhao YL. Spoligotyping and drug resistance analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from national survey in China. *PLoS One*. 2012; 7(3):e32976.
- Pansy F., Stander H., Donovick R. 1952. In vitro studies on isonicotinic acid hydrazide. *Am. Rev. Tuberc.* 1952; 65: 761–764.
- Panteix G, Gutierrez MC, Boschioli ML, Rouviere M, Plaidy A, Pressac D, Porcheret H, Chyderiotis G, Ponsada M, Van Oortegem K, Salloum S, Cabuzel S, Bañuls AL, Van de Perre P, Godreuil S. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *J Med Microbiol*. 2010; 59(pt 8):984–989.
- Papakala E, Manika K, Papadaki E, Kyreltsi P, Kostanta S, et al. Outcome of tuberculosis treatment at the pulmonary-tuberculosis department A.U.Th. during the three-year period 2012-2014. *Pneumon*. 2017;30:141–150.
- Papaventsis D., Nikolaou S., Karabela S., Ioannidis P., Konstantinidou E., Marinou I., Sainti A., Kanavaki S. Tuberculosis in Greece: bacteriologically confirmed cases and anti-tuberculosis drug resistance, 1995-2009. *Eurosurveillance* 2010; 15:28.
- Park YK, Shin S, Ryu S, Cho SN, Koh WJ, Kwon OJ, Shim YS, Lew WJ, Bai GH. Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Microbiol Methods*. 2005; 63(2):165-72.
- Parsons LM, Salfinger M, Clobridge A, Dormandy J, Mirabello L, Polletta VL, Sanic A, Sinyavskiy O, Larsen SC, Driscoll J, Zickas G, Taber HW. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2218 –2225.
- Parte AC, LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(Database issue):D613-616.
- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *The Lancet Infectious diseases*. 2010; 10 (2):103–11.

- Pathrikar T. G., Bansal V. P., Mulay M. V, Ghogare H. S. Comparison of Ziehl-Neelsen Smear Microscopy and AFB Culture in a Resource Limited Setting from Various Clinical Samples. *International Journal of Health Sciences and Research*. 2020;10: 4.
- Pawelczyk J, Brzostek A, Kremer L, Dziadek B, Rumijowska-Galewicz A, Fiolka M, Dziadek J. AccD6, a Key Carboxyltransferase Essential for Mycolic Acid Synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, Is Dispensable in a Nonpathogenic Strain, *J Bacteriol*. 2011;193(24): 6960–6972
- Payton M, Auty R, Delgoda R, Everett M, Sim E. Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. *J. Bacteriol*. 1999: 181:1343–1347.
- Perdigão J, Macedo R, João I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: A molecular epidemiological perspective. *Microbial Drug Resistance*. 2008;14(2):133-143.
- Perdigão J, Macedo R, Machado D, Silva C, Jordão L, Couto I, Viveiros M, Portugal I. GidB mutation as a phylogenetic marker for Q1 cluster *Mycobacterium tuberculosis* isolates and intermediate-level streptomycin resistance determinant in Lisbon, Portugal, *Clin Microbiol Infect* 2014;20: 0278–0284
- Perdigão J., Macedo R., Ribeiro A., Brum L., Portugal I. Genetic characterisation of the ethambutol resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis*: prevalence and significance of embB306 mutations. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009: 33: 334–338
- Perry MD, White PL, Ruddy M. Potential for use of the Seegene Anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a regional reference laboratory. *J Clin Microbiol*. 2014 : 52(5):1708-1710.
- Pethe K, Sequeira PC, Agarwalla S, Rhee K, Kuhen K, Phong WY, Patel V, Beer D, Walker JR, Duraiswamy J, Jiricek J, Keller TH, Chatterjee A, Tan MP, Ujjini M, Rao SPS, Camacho L, Bifani P, Mak PA, Ma I, Barnes SW, Chen Z, Plouffe D, Thayalan P, Ng SH, Au M, Lee BH, Tan BH, Ravindran S, Nanjundappa M, Lin X, Goh A, Lakshminarayana SB, Shoen C, Cynamon M, Kreiswirth B, Dartois V, Peters EC, Glynn R, Brenner S, Dick T. A chemical

- genetic screen in *Mycobacterium tuberculosis* identifies carbon-source-dependent growth inhibitors devoid of in vivo efficacy. *Nat Commun.* 2010; 1:57–58.
- Petruccioli E, Scriba TJ, Petrone L, Hatherill M, Cirillo DM, Joosten SA, Ottenhoff TH, Denkinger CM, Goletti D. Correlates of tuberculosis risk: predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2016;48, 1751–1763.
- Pfyffer GE, Palicova F, Rüschi-Gerdes S. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol* 2002;40:1670-1674.
- Pfyffer GE. *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures.* 2007; 1: 543.
- Piatek AS, Telenti A, Murray MR et al. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 103–110.
- Piddington D. L., Kashkouli A., Buchmeier N. A. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg²⁺ levels. *Infect Immun* 2000; 68:4518–4522.
- Piddock L.J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 382–402.
- Piersimoni C, Mustazzolu A, Giannoni F, Bornigia S, Gherardi G, Fattorini L. 2013. Prevention of false resistance results obtained in testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the Bactec MGIT 960 system using a reduced inoculum. *J. Clin. Microbiol.* 51:291–294.
- Piersimoni C, Olivieri A, Benacchio L, Scarparo C. Current perspectives on drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex: the automated nonradiometric systems. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 20–28.
- Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, Scagnelli M, Rigon A, Ruggiero G, Goglio A. Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study.

- Plinke C, Cox HS, Kalon S, et al. Tuberculosis ethambutol resistance: concordance between phenotypic and genotypic test results, *Tuberculosis (Edin)* , 2009: 89 448-452
- Plinke C, Cox HS, Zarkua N, Karimovich HA, Braker K, Diel R, Rüsç-Gerdes S, Feuerriegel S, Niemann S. embCAB sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without embB306 mutation. *J Antimicrob Chemother.* 2010: 65(7):1359-67.
- Plinke C, Walter K, Aly S, Ehlers S, Niemann S. *Mycobacterium tuberculosis* embB codon 306 mutations confer moderately increased resistance to ethambutol in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011: 55:2891–2896.
- Plinke C., S. Rusch-Gerdes, S. Niemann. 2006. Significance of mutations in embB codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006: 50: 1900–1902,
- Portevin, D., Gagneux, S., Comas, I., Young, D. Human macrophage responses to clinical isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* complex discriminate between ancient and modern lineages. *PLoS Pathog.* 2011: 7, e1001307
- Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschioli ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnyk A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol.* 2005: 43(10):4984-4992.
- Projahn M, Koser CU, Homolka S, Summers DK, Archer JA, Niemann S. Polymorphisms in isoniazid and prothionamide resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2011: 55:4408–4411
- Pym AS, Domenech P, Honoré N, Song J, Deretic V, Cole ST. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2001 :40(4):879-89
- Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of katG mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun.* 2002:70(9):4955-4960.

- Qian L, Van Embden JD, Van Der Zanden AG, Weltevreden EF, Duanmu H, Douglas JT. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. J Clin Microbiol. 1999 ;37(2):471-4
- Quémar A, Sacchetti JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittman R, Jacobs WR Jr, Blanchard JS. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry 1995; 4;34(26):8235-8241
- Quinn T., O'Mahony R., Baird A.W., Drudy D., Whyte P., Fanning S. Multidrug resistance in *Salmonella enterica*: efflux mechanisms and their relationships with the development of chromosomal resistance gene clusters. Curr. Drug Targets 2006: 7: 849– 860.
- Radhey S. Gupta, Brian Lo, and Jeen Son, Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera, Front Microbiol. 2018; 9: 67.
- Rahman MM, Rahim MR, Khaled A, Nasir TA, Nasrin F, Hasan MA Molecular Detection and Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Non-tuberculous *Mycobacterium* in the Clinical Specimens by Real Time PCR. Mymensingh Med J. 2017 Jul;26(3):614-620.
- Raizada N, Sachdeva KS, Chauhan DS, Malhotra B, Reddy K, Dave PV, et al. A multi-site validation in India of the line probe assay for the rapid diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis directly from sputum specimens. PLoS One 2014;9: e88626.
- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuberc Lung Dis 1998; 79: 3–29,
- Ramaswamy SV, Amin AG, Goksel S, Stager CE, Dou SJ, El Sahly H, Moghazeh SL, Kreiswirth BN, Musser JM. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2000: 44:326–336.
- Ramaswamy SV, Amin AG, Göksel S, Stager CE, Dou SJ, El Sahly H, Moghazeh SL, Kreiswirth BN, Musser JM. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(2):326-336.

- Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X, Wanger A, Quitugua T, Graviss EA. Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4):1241-1250.
- Ramirez-Busby SM, Rodwell TC, Fink L, Catanzaro D, Jackson RL, Pettigrove M, Catanzaro A, Valafar F. Multinational Analysis of Mutations and Heterogeneity in PZase, RpsA, and PanD Associated with Pyrazinamide Resistance in M/XDR *Mycobacterium tuberculosis*, *Sci Rep.* 2017; 7: 3790
- Ramirez-Busby SM, Valafar F. Systematic Review of Mutations in Pyrazinamidase Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates, *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(9):5267-77.
- Ramón-García S, Mick V, Dainese E, Martín C, Thompson CJ, De Rossi E, Manganelli R, Aínsa JA. Functional and genetic characterization of the tap efflux pump in *Mycobacterium bovis* BCG. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4):2074–2083.
- Ratlidge E, The physiology of the mycobacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 1976; 13: 115-244.
- Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4: 195–209.
- Raviglione M.C., Dye C., Schmidt S., Kochi A. Assessment of worldwide tuberculosis control. WHO Global Surveillance and Monitoring Project, *Lancet*, 1997; 350(9078):624-629.
- Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P.J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100, 13881–13886
- Raynaud C, Lanéelle MA, Senaratne RH, Draper P, Lanéelle G, Daffé M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology (Reading)*. 1999;145 (Pt 6):1359-1367.
- Reed M.B., Domenech P., Manca C., Su H., Barczak A.K., Kreiswirth B.N., Kaplan G., Barry 3rd, C.E. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature.* 2004; 431: 84-87.
- Reeves AZ, Campbell PJ, Sultana R, Malik S, Murray M, Plikaytis BB, Shinnick TM, Posey JE. Aminoglycoside cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* due to mutations in the

- 5' untranslated region of *whiB7*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1857-1865.
- Regmi SM, Coker OO, Kulawonganunчай S, Tongsimā S, Prammanānān T, Viratyosin W, Thāipisuttikul I, Chāiprasert A. Polymorphisms in drug-resistant-related genes shared among drug-resistant and pan-susceptible strains of sequence type 10, Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Mycobacteriol.* 2015; 4(1):67-72.
- Restrepo BI. Convergence of the tuberculosis and diabetes epidemics: renewal of old acquaintances. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45 (4): 436–8.
- Reuss FF. *Mem Soc Imperiale Naturalistes de Moscow*, 1809: 2, 327–337
- Rhee JT, Tanaka MM, Behr MA, Agasino CB, Paz EA, Hopewell PC, Small PM. Use of multiple markers in population-based molecular epidemiologic studies of tuberculosis, *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000 Dec;4(12):1111-1119
- Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, Almeida FM, Rezende AL, Lanes VR, Carvalho EC, Suffys PN, Mokrousov I, Lasunskāia EB. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol.* 2014;(7):2615-24.
- Richardson, M., Carroll, N.M., Engelke, E., van Der Spuy, G.D., Salker, F., Munch, Z., Gie, R.P., Warren, R.M., Beyers, N., Van Helden, P.D. Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strains in early cultures from patients in a high-incidence community setting. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40: 2750-2754.
- Rigouts L, Gumusboga M, de Rijk WB, Nduwamahoro E, Uwizeye C, de Jong B, et al. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for *Mycobacterium tuberculosis* isolates with specific *rpoB* mutations. *J Clin Microbiol* 2013;51:2641-2645.
- Rinder H, Thomschke A, Rušch-Gerdes S et al. Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17: 508–511
- Rinder H., Mieskes K.T., Tortoli E., Richter E., Casal M., Vaquero M., Cambau E., Feldmann K., Loscher T. Detection of *embB* codon 306 mutations in ethambutol resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples: a low-cost, rapid approach. *Mol. Cell. Probes* 2001; 15: 37–42,

- Rindi L, Bianchi L, Tortoli E et al. Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 94 -97
- Ristow M, Mohlig M, Rifai M, Schatz H, Feldmann K, Pfeiffer A. New isoniazid/ethionamide resistance gene mutation and screening for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Lancet* 1995;346:502-503.,
- Rodrigues, L., Machado, D., Couto, I., Amaral, L., Viveiros, M., Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Inf. Genet. Evol.* 2012: 12, 695-700.
- Roguin A. Rene Theophile Hyacinthe Laënnec (1781-1826): the man behind the stethoscope. *Clin Med Res.* 2006: 4(3):230-5.
- Romagnoli A, Petruccioli E, Palucci I, Camassa S, Carata E, Petrone L, Mariano S, Sali M, Dini L, Girardi E, Delogu G, Goletti D, Fimia GM. Clinical isolates of the modern *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 evade host defense in human macrophages through eluding IL-1 β -induced autophagy. *Cell Death Dis.* 2018: 24;9(6):624.
- Rondini, S., Mensah-Quainoo E., Troll H., Bodmer T., Pluschke G. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. *J. Clin. Microbiol.* 2003: 41:4231-4237.
- Rosales-Klintz S, Jureen P, Zalutskayae A, Skrahina A, Xu B, Hu Y, et al. Drug resistance-related mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographical regions. *International journal of mycobacteriology.* 2012;1(3):124-130
- Rossetti ML, Valim AR, Silva MS, Rodrigues VS. [Resistant tuberculosis: a molecular review]. *Rev Saude Publica.* 2002: 36: 525-532.
- Rouse, D.A., DeVito, J.A., Li, Z., Byer, H., Morris, S.L., Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol. Microbiol.* 1996: 22, 583-592.
- Rovina, N., Karabela, S., Constantoulakis, P., Michou, V., Konstantinou, K., Sgountzos, V. Roussos C., Poulakis N. MIRU-VNTR typing of drug-resistant tuberculosis isolates in Greece. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 2011: 5 (4), 229-236.

- Rozwarski DA, Grant GA, Barton DH, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC, Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis.*, Science. 1998: 2; 279(5347):98-102
- Rozwarski, D. A., G. A. Grant, D. H. R. Barton, W. R. Jacobs, and J. C. Sacchettini. Modification of the NADH of the isoniazid target (inhA) from *Mycobacterium tuberculosis.* Science 1998: 279:98–102.
- Ruiz P, Rodríguez-Cano F, Zerolo FJ, Casal M. Investigation of the in vitro activity of streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis.* Microb Drug Resist. 2002 : (2):147-9
- Ryan, F. Tuberculosis: the Greatest Story Never Told. Swift Publishers. 1992
- Ryll R., Kumazawa Y., Yano I. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids – a review. Microbiol. Immunol. 2001: 45: 801–811.
- Saelens JW, Lau-Bonilla D, Moller A, Xet-Mull AM, Medina N, Guzmán B, Calderón M, Herrera R, Stout JE, Arathoon E, Samayoa B, Tobin DM. Annotated Genome Sequences of 16 Lineage 4 *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Guatemala. Genome Announc. 2018: 15;6(7). pii: e00024-18.
- Safi H, Lingaraju S, Amin A et al. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl-b-D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. Nat Genet 2013: 45: 1190–7
- Safi H., Sayers B., Hazbón M.H., Alland D. Transfer of embB codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. Antimicrob. Agents Chemother. 2008: 52: 2027–2034
- Sahiratmadja E, Alisjahbana B, de Boer T, Adnan I, Maya A, Danusantoso H, Nelwan RH, Marzuki S, van der Meer JW, van Crevel R, van de Vosse E, Ottenhoff TH. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with tuberculosis disease activity and response to curative treatment. Infect. Immun. 2007: 75, 820–829.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988: 239: 487–491.

- Saiki, R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia" *Science*, 1985; 230: 1350–1354.
- Saint-Joanis B, Souchon H, Wilming M, Johnsson K, Alzari PM, Cole ST. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*. 1999;338(Pt 3):753–760.
- Saito H. Laboratory media for the cultivation of tubercle bacillus. *Kekkaku*. 1998; 73(5):329-337.
- Saito, H. "Laboratory media for the cultivation of tubercule bacillus. *Kekkaku* 1998; 73:329–337.
- Sakula. A. Robert Koch: centerary of the discovery of tuberce bacillus, 1882. *Thorax*. 1982; 37(4):246-51.
- Sala C, Forti F, Di Florio E, Canneva F, Milano A, Riccardi G, Ghisotti D. *Mycobacterium tuberculosis* FurA autoregulates its own expression. *J Bacteriol*. 2003 Sep;185(18):5357-5362
- Salfinger M, Heifets L B. Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1002–1004.
- Salfinger M., Crowle A.J., Reller L.B. Pyrazinamide and pyrazinoic acid activity against tubercle bacilli in cultured human macrophages and in the BACTEC system. *J. Infect. Dis*. 1990; 162: 201–207.
- Sambandamurthy VK, Wang X, Chen B, Russell RG, Derrick S, Collins FM, Morris SL, Jacobs WR, Jr. A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 2002;8:1171-1174
- Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Gómez LI, Lafoz MC, Jiménez MS, Ortega A, Lezcano MA, Van Soolingen D, Martín C; Spanish Working Group on MDR-TB. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1220-1227.

- Sampson. S., Warren. R., Richardson. M., van der Spuy. G., van Helden. IS6110 insertions in *Mycobacterium tuberculosis*: predominantly into coding regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001: 39: 3423-3424
- Sánchez JG, Kouznetsov VV. Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Braz J Microbiol*. 2010 : 41(2):270-277.
- Sanchez L, Londono D, Arango AI, Mattar S: In vitro activity of antituberculous agents against *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Bogota, DC (Colombia) evaluated by the E-test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999: 35: 109–112.
- Sanchez-Padilla E, Merker M, Beckert P, Jochims F, Dlamini T, Kahn P, et al. Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland. *N Engl J Med* 2015;372:1181e2.
- Sandgren A, Schepisi MS, Sotgiu G, Huitric E, Migliori GB, Manissero D, van der Werf MJ, Girardi E. Tuberculosis transmission between foreign- and native-born populations in the EU/EEA: a systematic review. *Eur Respir J*. 2014 : (4):1159-1171.
- Sandy J, Holton S, Fullam E, Sim E, Noble M. Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine N-acetyltransferase protein from *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Sci*. 2005 Mar;14(3):775-82.
- Sanger, F. , Nicklen, S. and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977: 74, 5463-7.
- Sanic A, Gunaydin M, Coban AY, Tokac, Cetin M. A comparison of the E-test and proportion methods for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Chemother*. 2000 :12(6):491-4.
- Sankar MM, Singh J, Diana SC, Singh S. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North Indian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2013: 93(1):75–83.
- Saravia JC, Appleton SC, Rich ML, Sarria M, Bayona J, Becerra MC. Retreatment management strategies when first-line tuberculosis therapy fails. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005: 9(4):421-429.

- Sarkar, R., Lenders, L., Wilkinson, K. A., Wilkinson, R. J., Nicol, M. P. Modern lineages of *Mycobacterium tuberculosis* exhibit lineage-specific patterns of growth and cytokine induction in human monocyte-derived macrophages. 2012: PLoS ONE 7, e43170 (2)
- Schaeffer ML, Agnihotri G, Volker C, Kallender H, Brennan PJ, Lonsdale JT. Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. J Biol Chem 2001: 276:47029–47037
- Schildkraut CI, Marmur J, Doty P. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. J Mol Biol. 1961 Oct;3:595-617.
- Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. Clin Microbiol Infect. 2017 Mar;23(3):154-160
- Schoonmaker MK, Bishai WR, Lamichhane G Nonclassical transpeptidases of *Mycobacterium tuberculosis* alter cell size, morphology, the cytosolic matrix, protein localization, virulence, and resistance to β -lactams. J Bacteriol. 2014: 196(7):1394-402
- Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1997: 41(3): 540-543
- Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 1996;2: 662–667
- Scotto G, Fazio V, Lo Muzio L. Tuberculosis in the immigrant population in Italy: state-of-the-art review. Infez Med. 2017: 25(3):199-209,
- Sechi, L. A., Pinna, M. P., Sanna, A., Pirina, P., Ginesu, F., Saba, F., Fadda, G. “Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non-HIVinfected patients.” Molecular and cellular probes, 1997: 11(4):281-285.
- Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review, PLoS One. 2015: (3):e0119628.

- Sekiguchi, J., T. Miyoshi-Akiyama, E. Augustynowicz-Kopeć, Z. Zwolska, F. Kirikae, E. Toyota, I. Kobayashi, K. Morita, K. Kudo, S. Kato, T. Kuratsuji, T. Mori and T. Kirikae. Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2007: 45(1): 179–192.
- Sensi, P. History of the development of rifampin. 1983: Rev Infect Dis 5 Suppl 3: S402-406
- Sethi S, Yadav R, Singh S, Khaneja R, Aggarwal A, Agarwal P, Behera D., GenoType MTBDRplus assay for screening and characterization of isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from India. Lett Appl Microbiol. 2017: 65(5):373-380.
- Shamputa IC, Lee J, Allix-Béguec C, Cho EJ, Lee JI, Rajan V, Lee EG, Min JH, Carroll MW, Goldfeder LC, Kim JH, Kang HS, Hwang S, Eum SY, Park SK, Lee H, Supply P, Cho SN, Via LE, Barry CE 3rd. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea. J Clin Microbiol. 2010 : 48(2):387-394.
- Sheen P, Requena D, Gushiken E, Gilman RH, Antiparra R, Lucero B, Lizárraga P, Cieza B, Roncal E, Grandjean L, Pain A, McNERNEY R, Clark TG, Moore D, Zimic M. A multiple genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance., BMC Genomics. 2017: 11;18(1):769.
- Shen X, Shen GM, Wu J, Gui XH, Li X, Mei J, DeRiemer K, Gao Q. Association between embB codon 306 mutations and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2007: 51(7):2618-20.
- Shen X, Shen GM, Wu J, Gui XH, Xia Li, Li X, Mei J, DeRiemer K, Gao Q. Association between embB codon 306 mutations and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2007: 51: 2618–2620
- Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE, 3rd, Stover CK. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1996: 272:1641–1643
- Sherman, D. R., P. J. Sabo, M. J. Hickey, T. M. Arain, G. G. Mahairas, Y. Yuan, C. E. Barry III, and C. K. Stover. 1995. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995: 3;92(14):6625-6629

- Sherman, D.R., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Arain, T.M., Mahairas, G.G., Yuan, Y., Barry, C.E., 3rd, Stover, C.K., Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Pro. Nat. Acad. Sci.* 1995;92, 6625-6629
- Shi D, Li L, Zhao Y, Jia Q, Li H, Coulter C, Jin Q, Zhu G. Characteristics of embB mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Henan, China. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2240 – 2247.,
- Shi R, Zhang J, Li C, Kazumi Y, Sugawara I. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. *Microbes Infect.* 2007; 9(14-15):1538-1544.
- Shi W, Chen J, Feng J, Cui P, Zhang S, Weng X, Zhang W, Zhang Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.* 2014 :3(8):e58.
- Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Yuan, H.; Lee, J.S.; Barry, C.E., 3rd.; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2011: 333, 1630–1632
- Shim TS, Jo KW. Medical treatment of pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Infect Chemother.* 2013 Dec;45(4):367-374.
- Shoeb HA, Bowman BU Jr, Ottolenghi AC, Merola AJ. Peroxidase-mediated oxidation of isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27(3):399-403
- Shoukrie, A., Fadel, H., & Tranesh, G. The yield of sputum smear direct microscopy using Ziehl-Neelsen Stain in comparison with Lowenstein Jensen culture on the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Tripoli-Libya. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 2008: 7(5), S55.
- Siddiqi N, Shamim M, Hussain S, Choudhary RK, Ahmed N, Prachee, Banerjee S, Savithri GR, Alam M, Pathak N, Amin A, Hanief M, Katoch VM, Sharma SK, Hasnain SE Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Patients in North India *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):443-50.
- Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, Morlock GP, Cooksey RC, Zaha A, Rossetti ML. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003: 41:4471–4474.

- Simons, S. O., Mulder, A., van Ingen, J., Boeree, M. J., van Soolingen, D. Role of rpsA gene sequencing in diagnosis of pyrazinamide resistance. *J. Clin. Microbiol.* 2013: 51, 382
- Singh P, Mishra AK, Malonia SK, Chauhan DS, Sharma VD, Venkatesan K, Katoch VM. The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria. *J. Commun. Dis.* 2006: 38:288–298,
- Singhal R, Myneedu VP. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriol.* 2015: 4(1):1-6.),
- Sirgel FA, Tait M, Warren RM, Streicher EM, Böttger EC, van Helden PD, Gey van Pittius NC, Coetzee G, Hoosain EY, Chabula-Nxiweni M, Hayes C, Victor TC, Trollip A. Mutations in the rrs A1401G Gene and Phenotypic Resistance to Amikacin and Capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Drug Resist.* 2012. 18(2):193-197.
- Siu GK, Zhang Y, Lau TC, Lau RW, Ho PL, Yew WW, Tsui SK, Cheng VC, Yuen KY, Yam WC. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:730–733.
- Slayden RA, Lee RE, Barry CE 3rd. Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 2000:38:514–525
- Slayden, R.A., Barry, C.E., The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Infect.* 2000: 2, 659-669
- Small, P.M., Shafer, R.W., Hopewell, P.C., Singh, S.P., Murphy, M.J., Desmond, E., Sierra, M.F., Schoolnik, G.K. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *New England Journal of Medicine*, 1993: 328: 1137-1144.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003: 16(3):463-496.
- Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol.* 2006: 239:220–225.
- Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, van Soolingen D, Hewinson RG, Smith JM. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol.* 2006 :21;239(2):220-5

- Smith T., Wolff K. A., Nguyen L. Molecular Biology of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Top Microbiol Immunol.2013: 374:53-80.
- Smittipat N, Juthayothin T, Billamas P, Jaitrong S, Rukseree K, Dokladda K, Chaiyasirinroje B, Disratthakit A, Chaiprasert A, Mahasirimongkol S, Yanai H, Yamada N, Tokunaga K, Palittapongarnpim P. Mutations in rrs, rpsL and gidB in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Thailand. J Glob Antimicrob Resist. 2016: 4:5-10.
- Soini H., Musser J. M. "Molecular diagnosis of mycobacteria",Clinical Chemistry, 2001:47(5): 809–814.
- Sola, C., Filliol, I., Gutierrez, M.C., Mokrousov, I., Vincent, V., Rastogi, N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. Emerging Infectious Diseases, 2001: 7: 390-396.
- Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Max Salfinger M. Direct comparison of the GenoType MTBC and genomic deletion assays in terms of ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2008;46(5):1854–1857.
- Somoskövi A, Magyar P Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with MB redox, Löwenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. J Clin Microbiol : 1999: 37(5):1366-9.
- Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res 2001;2:164-168
- Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res 2001;2:164-168,
- Sorlozano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto MJ, Piedrola G, Gutierrez J. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. J Microbiol Biotechnol. 2009: 19(10):1259-64.
- Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. Antimicrob Agents Chemother 2008: 52:2947–2949

- Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Martin A, Palomino JC, Rossetti ML, da Silva PE, Zaha A. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB gene. J Clin Microbiol 2011; 49: 2625–2630.
- Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Martin A, Palomino JC, Rossetti ML, da Silva PE, Zaha A. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB gene. J Clin Microbiol 2011; 49: 2625–2630.
- Spies FS, von Groll A, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Dalla Costa ER, Martin A, Palomino JC, Rossetti ML, Zaha A, da Silva PE. Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the rpsL, rrs, rpoB, and katG genes. Tuberculosis (Edinb). 2013 ; 93(2):150-4
- Springer B, Master S, Sander P, Zahrt T, McFalone M, Song J, Papavinasasundaram KG, Colston MJ, Boettger E, Deretic V. Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of ahpC in virulent and avirulent strains and effect of ahpC inactivation. Infect Immun. 2001; 69(10):5967-5973.
- Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA 2nd, Siddiqui S, Khalaf CN, Kreiswirth BN, Bifani P, Adams LG, Ficht T, Perumaalla VS, Cave MD, van Embden JD, Musser JM. Identification of a polymorphic nucleotide in oxyR specific for *Mycobacterium bovis*. J Clin Microbiol. 1996; 34(8):2007-2010.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer K E, Williams D L, Kreiswirth B N, Musser J M. Characterization of rpsL and rrs Mutations in Streptomycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Diverse Geographic localities. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(4): 1024–1026.
- Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Deretic V, Musser JM. Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41: 600–606.
- Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR Jr, Telenti A, Musser JM. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41, 1677-1681.

- Srivastava S, Ayyagari A, Dhole TN, Nyati KK, Dwivedi SK. emb nucleotide polymorphisms and the role of embB306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethambutol. *Int J Med Microbiol.* 2009 :299(4):269-280.
- Ssengooba W, Nakayita G, Namaganda CC, Joloba ML. Agreement of Middle brook 7H10 with Lowenstein Jensen and accuracy of the Sensititre MYCOTB plate using either method as a reference standard for *Mycobacterium tuberculosis* first line drug susceptibility testing. *PLoS One.* 2018; 28;13(6):e0199638.
- Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, Shinnick TM, Posey JE. 2009. Mutations at embB codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1061–1066.
- Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, Shinnick TM, Posey JE. Mutations at embB codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1061–1066.
- Stavrum, R., Mphahlele, M., Ovreas, K., Muthivhi, T., Fourie, P.B., Weyer, K. & Grewal, H.M. High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009; 47: 1848-1856.
- Steingart K.R., Henry M., Ng V. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis, a systematic review. *Lancet Infect. Dis.*, 2006; 6 (9): 570-581
- Stern S., Powers T., Changchien L.M., Noller H.F. Interaction of ribosomal proteins S5, S6, S11, S12, S18 and S21 with 16S rRNA. 1988: *J. Mol. Biol.* 201: 683–695
- Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 1990;248:189-194
- Storz, G., Imlay, J.A., Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999;2, 188–194.
- Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Ann. Rev. Biochem.* 1978: 47:819–846.
- Suarez J, Rangelova K, Schelvis JP, Magliozzo RS. Antibiotic resistance in *M. tuberculosis* Peroxidase intermediate bypass causes poor isoniazid activation by the Ser315Gly mutant of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG). *J Biol Chem.* 2009: 284:16146-16155

- Sun H, Zhang C, Xiang L, Pi R, Guo Z, Zheng C, Li S, Zhao Y, Tang K, Luo M, Rastogi N, Li Y, Sun Q. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Sichuan, China and the association between Beijing-lineage and dual-mutation in gidB. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016; 96:102-6.
- Sun YJ, Luo JT, Wong SY, Lee AS. Analysis of rpsL and rrs mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(3):287-289
- Sun Z, Chao Y, Zhang X, Zhang J, Li Y, Qiu Y, Liu Y, Nie L, Guo A, Li C. Characterization of Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in China, *J Clin Microbiol*. 2008 Dec;46(12):4075-4077.
- Sun Z, Zhang Y. Reduced pyrazinamidase activity and the natural resistance of *Mycobacterium kansasii* to the antituberculosis drug pyrazinamide, *Antimicrob Agents Chemother*, 1999; 43 : 537-42
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsç-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D., Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*., *J Clin Microbiol*. 2006 ;44(12):4498-510.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C., Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units., *J Clin Microbiol*. 2001 : 39(10):3563-71
- Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, et al. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet*. 2013; 45:172–179.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C., Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome., *Mol Microbiol*. 2000 : 36(3):762-771.

- Tadesse M, Abebe G, Abdissa K, Aragaw D, Abdella K, Bekele A, Bezabih M, Apers L, de Jong BC, Rigouts L. GeneXpert MTB/RIF Assay for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis on concentrated fine needle aspirates in high tuberculosis burden settings. PLoS One. 2015;10:e0137471. ,
- Tadesse M, Aragaw D, Dimah B, Efa F, Abdella K, Kebede W, Abdissa K, Abebe G. Drug resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* from pulmonary tuberculosis patients in Southwest Ethiopia. Int J Mycobacteriol. 2016; 5(2):185-91.
- Takayama K, Armstrong EL, Kunugi KA et al. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother 1979; 16: 240-2
- Takayama K, Wang L, David HL, Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*., Antimicrob Agents Chemother. 1972 : 2(1):29-35.
- Takayama, K, & Kilburn, J. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.1989;33(9), 1493-1499
- Talip BA, Sleator RD, Lowery CJ, Dooley JS, Snelling WJ. An Update on Global Tuberculosis (TB). Infect Dis (Auckl). 2013; 21; 6: 39-50.
- Tan Y, Hu Z, Zhang T, Cai X, Kuang H, Liu Y, Chen J, Yang F, Zhang K, Tan S, Zhao Y. Role of *pncA* and *rpsA* gene sequencing in detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from southern China. J Clin Microbiol 2014; 52: 291-297
- Tang Y.; Sussman M; Liu D; Poxton I; Schwartzman J. Molecular Medical Microbiology. Allison D.G., Lambert P. A., (2nd Edition), 2015: 32 : 583-598
- Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, Takiff HE, Cole ST. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. J. Clin. Microbiol. 1997; 35:719-723.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647-650

- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2054–2058
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR, Jr. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* 1997; 3:567–570,
- Tessema B, Beer J, Merker M, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC, Niemann S. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. *BMC infectious diseases*. 2013;13:131
- Thapa J, Nakajima C, Maharjan B, Poudell A, Suzuki Y. Molecular characterization of *Mycobacterium orygis* isolates from wild animals of Nepal. *Jpn J Vet Res*. 2015; 63(3):151-158.
- Theron G, Peter J, Richardson M, Barnard M, Donegan S, Warren R, Steingart KR, Dheda K. The diagnostic accuracy of the GenoType(®) MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;(10):CD010705.
- Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1990 :28(12):2668-73.
- Thorson A, Long NH, Larsson LO: Chest X-ray findings in relation to gender and symptoms: a study of patients with smear positive tuberculosis in Vietnam. *Scand J Infect Dis* 2007: 39:33-37.
- Thwaites G, Caws M, Chau TT, D'Sa A, Lan NT, Huyen MN, Gagneux S, Anh PT, Tho DQ, Torok E, Nhu NT, Duyen NT, Duy PM, Richenberg J, Simmons C, Hien TT, Farrar J. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1363-1368.
- Tiberi S, Scardigli A, Centis R, D'Ambrosio L, Muñoz-Torrico M, Salazar-Lezama MÁ, Spanevello A, Visca D, Zumla A, Migliori GB, Caminero Luna JA. Classifying new anti-

tuberculosis drugs: rationale and future perspectives. *Int J Infect Dis.* 2017 Mar;56:181-184.

Tomasichio M, Theron G, Pietersen E, Streicher E, Stanley-Josephs D, van Helden P, Warren R, Dheda K. The diagnostic accuracy of the MTBDRplus and MTBDRsl assays for drug-resistant TB detection when performed on sputum and culture isolates. *Sci Rep.* 2016;6:17850.

Torres JN, Paul LV, Rodwell TC, Victor TC, Amallraja AM, Elghraoui A, Goodmanson AP, Ramirez-Busby SM, Chawla A, Zadorozhny V, Streicher EM, Sirgel FA, Catanzaro D, Rodrigues C, Gler MT, Crudu V, Catanzaro A, Valafar F. Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates. *Emerg Microbes Infect.* 2015: 4(7):e42.

Tortoli E. Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties. *Infect. Genet. Evol.* 2012: 12, 827–831.

Toungousova, O.S., Sandven, P., Mariandyshv, A.O., Nizovtseva, N.I., Bjune, G. & Caugant, D.A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002: 40: 1930-1937.

Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V. Characterisation of rpsL, rrs and embB mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol.* 2004:155(10):830-834.

Tram TTB, Nhung HN, Vijay S, Hai HT, Thu DDA, Ha VTN, Dinh TD, Ashton PM, Hanh NT, Phu NH, Thwaites GE, Thuong NTT. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Is Associated With Sputum Pre-treatment Bacterial Load, Lineage, Survival in Macrophages, and Cytokine Response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 : 27;8:417

Traore H, Fissette K, Bastian I, Devleeschouwer M, Portaels F. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance, *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000: 4: 481-484

Trusov A, Bumgarner R, Valijev R, Chestnova R, Talevski S, Vragoterova C, Neeley ES. Comparison of Lumin LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 836-841

- Tsenova, L., Ellison, E., Harbacheuski, R., Moreira, A.L., Kurepina, N., Reed, M.B., Mathema, B., Barry, C.E., Kaplan, G. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005: 192: 98-106.
- Tudó G, Rey E, Borrell S, Alcaide F, Codina G, Coll P, Martín-Casabona N, Montemayor M, Moure R, Orcau A, Salvadó M, Vicente E, González-Martín J. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J Antimicrob Chemother*. 2010: 65(11):2341-2346.
- Tudó G, Rey E, Borrell S, Alcaide F, Codina G, Coll P, Martín-Casabona N, Montemayor M, Moure R, Orcau A, Salvadó M, Vicente E, González-Martín J. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J Antimicrob Chemother*. 2010: 65(11):2341-2346.
- Unea Y, Mori T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 2007: 30: 415-425.
- Unissa A.N., Selvakumar N, Narayanan S. Characterization of isoniazid-resistant mutant (S315R) catalase-peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Med. Sci. Tech*. 2011: 4 13-22.
- Upton AM, Mushtaq A, Victor TC, Sampson SL, Sandy J, Smith DM, van Helden PV, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase of *Mycobacterium tuberculosis* is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. *Mol Microbiol* 2001:42:309–317
- Valvatne H, Syre H, Kross M, Stavrum R, Ti T, Phyu S, Grewal HM. Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing. *J Antimicrob Chemother* 2009: 64:694–701. 131.
- Valvatne H, Syre H, Kross M, Stavrum R, Ti T, Phyu S, Grewal HM. Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing. *J Antimicrob Chemother*. 2009: 64(4):694-701.

- Van Deun A, Wright A, Zignol M, Weyer K, Rieder HL. Drug susceptibility testing proficiency in the network of supranational tuberculosis reference laboratories. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2011; 15:116–124
- Van Deutekom H, Supply P, Haas PE, Willery E, Hoijs SP, Locht C, Coutinho RA, Van Soolingen D. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. 2005; *J Clin Microbiol* 43:4473-4479.
- van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R. & Shinnick, T.M. (Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993; 31: 406-409
- van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(4):653-5.
- van Ingen J, Simons S, de Zwaan R, van der Laan T, Kamst-van Agterveld M, Boeree MJ, van Soolingen D. Comparative study on genotypic and phenotypic second-line drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2010 :48(8):2749-2753.
- Van Rie A, Warren R, Mshanga I, Jordaan AM, van der Spuy GD, Richardson M, Simpson J, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD, Victor TC. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):636-41
- van Rie, A., Warren, R., Richardson, M., Victor, T.C., Gie, R.P., Enarson, D.A., Beyers, N., van Helden, P.D. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *New England Journal of Medicine*, 1999; 341: 1174-1179.
- van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR et al. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000; 182: 1788–1790

- van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000;182:1788–1790.
- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology.*, 1991; 29: 2578-2586.,
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997; 47:1236–1245.
- Vareldzis BP, Grosset J, de Kantor I, Crofton J, Laszlo A, Felten M, Raviglione MC, Kochi A. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. *Tubercle and Lung Disease*, 1994; 75: 1-7
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater K.F, van Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 2007; 71:495-548.
- Verma JS, Gupta Y, Nair D, Manzoor N, Rautela R.S, Rai A, Katoch, VM. Evaluation of gidB alterations responsible for streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 2014; 69(11):2935-2941.
- Vijdea R, Stegger M, Sosnovskaja A, Andersen AB, Thomsen VØ, Bang D Multidrug-resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 2008; 27(11):1079-86.
- Vilcheze C, Av-Gay Y, Attarian R, Liu Z, Hazbon MH, Colangeli R, Chen B, Liu W, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR, Jr. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.*, 2008; 69:1316–1329
- Vilchèze C, Jacobs WR Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr.*, 2014 :2(4):MGM2-0014-2013.

- Vilchèze C, Jacobs WR Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:35-50.
- Vilchèze C, Morbidoni HR, Weisbrod TR, Iwamoto H, Kuo M, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr, Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*., *J Bacteriol.* 2000; 182(14):4059-67
- Vilcheze C, Weisbrod TR, Chen B, Kremer L, Hazbon MH, Wang F, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR, Jr. Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2005; 49:708–720
- Vilchèze C, Wang F, Arai M, Hazbón MH, Colangeli R, Kremer L, Weisbrod TR, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid. *Nat. Med.*, 2006;12: 1027– 1029
- Villellas C, Aristimuño L, Vitoria MA, Prat C, Blanco S, García de Viedma D, Domínguez J, Samper S, Aínsa JA. Analysis of mutations in streptomycinresistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *J Clin Microbiol.*, 2013; 51:2124-2130.
- Viveiros M, Leandro C, Rodrigues L, Almeida J, Bettencourt R, Couto I, Carrilho L, Diogo J, Fonseca A, Lito L, Lopes J, Pacheco T, Pessanha M, Quirim J, Sancho L, Salfinger M, Amaral L. Direct application of the INNO-LiPA Rif.TB line-probe assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains and detection of rifampin resistance in 360 smear-positive respiratory specimens from an area of high incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol.*, 2005;43:4880-4884
- Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Pagès JM., Amaral L. Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli*. *PLoS ONE.*, 2007; 2(4): e365.
- Vu TT, Daniel SJ, Quach C. Nontuberculous mycobacteria in children: a changing pattern. *J Otolaryngol.*, 2005; 34(Suppl 1): S40-4.
- Wada T, Fujihara S, Shimouchi A, Harada M, Ogura H, Matsumoto S, Hase A. High transmissibility of the modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* in homeless patients of Japan. *Tuberculosis (Edinb).*, 2009; 89(4):252-255.

- Wade, M. M., Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci.*, 2004: 9: 975-994
- Wahab HA, Choong YS, Ibrahim P, Sadikun A, Scior T. Elucidating isoniazid resistance using molecular modeling. *J Chem Inf Model.*, 2009: 49, 97-107.
- Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dediccoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis.*, 2013: 13:137-146
- Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Del Ojo Elias C, Bradley P, Iqbal Z, Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ, Clifton DA, Kapatai G, Ip CLC, Bowden R, Drobniewski FA, Allix-Béguec C, Gaudin C, Parkhill J, Diel R, Supply P, Crook DW, Smith EG, Walker AS, Ismail N, Niemann S, Peto TE. Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study *Lancet Infect Dis.*, 2015: 15(10):1193-1202.
- Wall S, Ghanekar K, McFadden J, Dale JW. Context-sensitive transposition of IS6110 in mycobacteria. *Microbiology (Reading)*. 1999 :145 (Pt 11):3169-3176.
- Wamala D, Okee M, Kigozi E, Couvin D, Rastogi N, Joloba M, Kallenius G. Predominance of Uganda genotype of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Ugandan patients with tuberculous lymphadenitis. *BMC research notes.*, 2015: 8:398
- Wampande EM, Naniima P, Mupere E, Kateete DP, Malone LL, Stein CM, Mayanja-Kizza H, Gagneux S, Boom WH, Joloba ML. Genetic variability and consequence of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 3 in Kampala-Uganda. *PLoS One.*, 2019 :9;14(9):e0221644.
- Wang F, Jain P, Gulten G, Liu Z, Feng Y, Ganesula K, Motiwala AS, Ioerger TR, Alland D, Vilchèze C, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase is not a target relevant to the antitubercular activity of isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2010: 54(9):3776-3782.
- Wang XD, Gu J, Wang T, Bi LJ, Zhang ZP, Cui ZQ, Wei HP, Deng JY, Zhang XE. Comparative analysis of mycobacterial NADH pyrophosphatase isoforms reveals a novel mechanism for isoniazid and ethionamide inactivation. *Mol Microbiol.*, 2011: 82, 1375-91.

- Wanger A, Mills K. Testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, and streptomycin by using Etest. *J Clin Microbiol.*, 1996: 364: 1672–1676.
- Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, Gey van Pittius NC, van Helden PD. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *American Journal of Respiratory and Critical Care*, 2004: 169: 610–614.
- Watson JD, Myers RM, Caudy AA, Witkowski J. *Recombinant DNA, Genes and Genomes – A Short Course*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 2007
- Wayne L.G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994: 13: 908–914.
- Wei CJ, Lei B, Musser JM, Tu SC. Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in *InhA* inhibitor production. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2003: 47(2):670-675.
- Lu W, Feng Y, Wang J, Zhu L. Evaluation of MTBDRplus and MTBDRsl in Detecting Drug-Resistant Tuberculosis in a Chinese Population, *Disease Markers.*, 2016: 9.
- Wengenack NL, Uhl JR, St Amand AL, Tomlinson AJ, Benson LM, Naylor S, Kline BC, Cockerill FR, 3rd, Rusnak F. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG (S315T) is a competent catalaseperoxidase with reduced activity toward isoniazid., *J Infect Dis.*, 1997: 176:722– 727.
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: A web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res.*, 2010: 38:326–31.
- Werngren J, Alm E, Mansjö M. Non-pncA gene-mutated but pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: why is that? *J Clin Microbiol.*, 2017:55: 1920–1927
- Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM, York T, Sampson SL, Streicher EM, van Helden PD, van Rie A. A Global Perspective on Pyrazinamide Resistance: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.*, 2015: 10(7) :e0133869
- Whitney JB, Wainberg MA, Isoniazid the frontline of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *McGill. J. Med.*, 2002: 6, 114-123

- WHO, Global tuberculosis report 2019 Geneva: World Health Organization, 2018
- WHO, Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Geneva, WHO, 2010
- WHO, Rapid Communication: Molecular assays as initial tests for the diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance, 2020
- WHO, Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis, Geneva, World Health Organization; 2018
- WHO. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children, second edition. Geneva: World Health Organization; 2014 Geneva: World Health Organization; 2014.
- WHO. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care (2017 update). WHO, Geneva, 2017
- WHO. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update. Geneva:2016
- WHO. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs–policy guidance. Geneva: WHO; 2016
- WHO. Treatment of Tuberculosis Guidelines. WHO, Geneva, 2010,
- Wiens KE, Woyczynski LP, Ledesma JR, Ross JM, Zenteno-Cuevas R, Goodridge A, Ullah I, Mathema B, Djoba Siawaya JF, Biehl MH, Ray SE, Bhattacharjee NV, Henry NJ, Reiner RC Jr, Kyu HH, Murray CJL, Hay SI. Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis. BMC Med., 2018; 0;16(1):196
- Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture system II for growth and detection of mycobacteria, J. Clin. Microbiol., 2000; 38: 4167-4170.
- Wilming M, Johnsson K. Spontaneous Formation of the Bioactive Form of the Tuberculosis Drug Isoniazid. Angew Chem Int Ed Engl., 1999;38(17):2588-2590
- Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rane S, Brown PO, Schoolnik GK. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1999; 96:12833–12838

- Witney AA, Cosgrove CA, Arnold A, Hinds J, Stoker NG, Butcher PD. Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Med., 2016: 14:46
- Wolucka BA, McNeil MR, de Hoffmann E, Chojnacki T, Brennan PJ. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. The Journal of Biological Chemistry., 1994: 269(37), 23328-23335,
- Wong HC, Liu G, Zhang YM, Rock CO, Zheng J. The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem., 2002: 277:15874–15880
- Wong SY, Lee JS, Kwak HK, Via LE, Boshoff HI, Barry III CE. Mutations in gidB confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother., 2011: 55:2515–2522.
- Wood R, Morrow C, Barry CE 3rd, Bryden WA, Call CJ, Hickey AJ, Rodes CE, Scriba TJ, Blackburn J, Issarow C, Mulder N, Woodward J, Moosa A, Singh V, Mizrahi V, Warner DF. Real-Time Investigation of Tuberculosis Transmission: Developing the Respiratory Aerosol Sampling Chamber (RASC). PLoS One., 2016: 11(1) :e0146658.
- Woods G.L. Molecular techniques in mycobacterial detection. Archives of pathology & laboratory medicine., 2001:125(1): 122-126.
- World Health Organization (WHO). Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. WHO/HTM/TB/2013.14. Geneva, Switzerland: WHO; 2013.
- World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control Report. 2019. World Health Organization: Geneva. 2019.
- World Health Organization (WHO). Next-generation Xpert® MTB/RIF Ultra assay recommended by WHO. 2017.
- World Health Organization Drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2002-2007. Fourth global report. WHO, Geneva, Switzerland, 2008.
- World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2011 update. Geneva, WHO, 2011.

- Xia H, Song YY, Zhao B, Kam KM, O'Brien RJ, Zhang ZY, Sohn H, Wang W, Zhao YL. Multicentre evaluation of Ziehl-Neelsen and light-emitting diode fluorescence microscopy in China. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2013: 17: 107-112.
- Xu HB, Jiang RH, Sha W, Li L, Xiao HP. PCR-single-strand conformational polymorphism method for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.*, 2010: 48:3635-3640.
- Xu Y, Jia H, Huang H, Sun Z, Zhang Z. Mutations Found in embCAB, embR, and ubiA Genes of Ethambutol-Sensitive and -Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China. *Biomed Res Int.*, 2015: 951706.
- Xu Y, Wu J, Liao S, Sun Z. Treating tuberculosis with high doses of anti-TB drugs: mechanisms and outcomes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 2017: 16(1):67.
- Yadav R, Sethi S, Dhatwalia SK, Gupta D, Mewara A, Sharma M. Molecular characterisation of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North India. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2013: 17(2):251-257
- Yadav RN, Singh BK, Sharma SK, Sharma R, Soneja M, Sreenivas V, et al. Comparative evaluation of GenoType MTBDRplus line probe assay with solid culture method in early diagnosis of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) at a tertiary care centre in India. *PLoS One.*, 2013: 8:e72036
- Yam WC, Tam CM, Leung CC, Tong HL, Chan KH, Leung ET, Wong KC, Yew WW, Seto WH, Yuen KY, Ho PL. Direct Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Specimens by -PCR-DNA sequencing. *J Clin Microbiol.*, 2004: 42:4438-4443
- Yamada H, Bhatt A, Danev R, Fujiwara N, Maeda S, Mitarai S, Chikamatsu K, Aono A, Nitta K, Jacobs WR Jr, Nagayama K. Nonacid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis* DeltakasB mutant correlates with the cell envelope electron density. *Tuberculosis (Edinb).*, 2012: 92:351-357.
- Yamane N, Chilima BZ, Tosaka M, Okazawa Y, Tanno K Determination of antimycobacterial activities of fluoroquinolones against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: comparative determination with egg-based Ogawa and agar-based Middlebrook 7H10 media. *Kekkaku.* 1996: 71(8):453-8.

- Yan JJ, Huang AH, Tsai SH, Ko WC, Jin YT, Wu JJ. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2000: 37(1):25-30.
- Yan JJ, Jou R, Ko WC, Wu JJ, Yang ML, Chen HM. The use of variable-number tandem-repeat mycobacterial interspersed repetitive unit typing to identify laboratory cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.*, 2005: 52: 21-28.
- Yang ZH, Ijaz K, Bates JH, Eisenach KD, Cave MD. Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110, *J Clin Microbiol.*, 2000: 38(10):3572-6.
- Yeh RW, Hopewell PC, Daley CL. Simultaneous infection with two strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.*, 1999: 3: 537-539.
- Yeh RW, Ponce de Leon A, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell PC, Small PM. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes, *The Journal of Infectious Diseases.*, 1998: 177: 1107-1111.
- Yew WW, Leung CC. Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007. *Respirology.* 2008 13(1):21-46.
- Yip CK, AuYeang CK, Yeung CY, Kam KM, Yip PC, Cheng AF. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007: 59:866 -873.
- Yoon JH, Nam JS, Kim KJ, Choi Y, Lee H, Cho SN, Ro YT. Molecular characterization of drug-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with tuberculosis in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012: 72:52-61
- Yoon JH, Nam JS, Kim KJ, Ro YT. Simple and rapid discrimination of embB codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by a real-time PCR assay using an LNA-TaqMan probe. *J. Microbiol. Methods.* 2013: 92:301-306.
- Young D, Verreck FA. Creativity in tuberculosis research and discovery. *Tuberculosis.*, 2012: 92 (Suppl 1): S14-S16

- Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol.*, 2009;17:183–188
- Yuan L, Huang Y, Mi LG, Li YX, Liu PZ, Zhang J, Liang HY, Li F, Li H, Zhang SQ, Li WJ. There is no correlation between sublineages and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage clinical isolates in Xinjiang, China. *Epidemiol Infect.*, 2015: 143(1):141-9
- Yuen LK, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *J Clin Microbiol.*, 1999;37:3844e50.
- Yuksel P, Saribas S, Bagdatli Y. Comparison of the VersaTrek and BACTEC MGIT 960 systems for the contamination rate, time of detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens, *African Journal of Microbiology Research.*, 2011: 5(9):985-989.
- Zammarchi L, Bartalesi F, Bartoloni A. Tuberculosis in tropical areas and immigrants. *Mediterr J Hematol Infect Dis.*, 2014
- Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.*, 2011: 49:4138-41,
- Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, Zhang XL, Wang HH. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol.*, 2005: 43: 5477–5482.
- Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.*, 2013: 2:e34
- Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2003: 7:6–21.,
- Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol.*, 2002: 51: 42– 49.
- Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr.*, 2013: 2:MGM2-0023-2013

- Zhang Y, Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull GF, Jacobs WR Jr, eds. Molecular genetics of mycobacteria. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2000; 235–256
- Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 2009; 13:1320–1330.
- Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J. Bacteriol., 1999; 181: 2044–2049.
- Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. J. Antimicrob. Chemother., 2003; 52: 790–795
- Zhang Z, Wang Y, Pang Y, Kam KM. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol., 2014; 52(2):638-41.
- Zhang, LX, Tu DH, Enarson DA. The impact of directly-observed treatment on the epidemiology of tuberculosis in Beijing. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2000; 4: 904-910.
- Zhang, Y, B. Heym B, Allen D. Young, and S. Cole. The catalaseperoxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature., 1992; 358:591–593.
- Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 2003; 7, 6–21.
- Zhang Y, Young D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Antimicrob.Chem., 1994; 34, 313-319
- Zhao LL, Liu HC, Sun Q, Xiao TY, Zhao XQ, Li GL, et al. Identification of mutations conferring streptomycin resistance in multidrug-resistant tuberculosis of China. Diagn Microbiol Infect Dis., 2015; 83:150–153.
- Zhao LL, Sun Q, Liu HC, Wu XC, Xiao TY, Zhao XQ, Li GL, Jiang Y, Zeng CY, Wan KL. Analysis of *embCAB* mutations associated with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. Antimicrob Agents Chemother., 2015; 59(4):2045-2050.

- Zhou Y, van den Hof S, Wang S, Pang Y, Zhao B, Xia H, Anthony R, Ou X, Li Q, Zheng Y, Song Y, Zhao Y, van Soolingen D. Association between genotype and drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in China in a national drug resistance survey. PLoS One., 2017: 23;12(3): e0174197.
- Zhu L, Zhong J, Jia X, Liu G, Kang Y, Dong M, Zhang X, Li Q, Yue L, Li C, Fu J, Xiao J, Yan J, Zhang B, Lei M, Chen S, Lv L, Zhu B, Huang H, Chen F. Precision methylome characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) using PacBio single-molecule real-time (SMRT) technology. Nucleic Acids Res., 2016: 29;44(2):730-743.
- Zimhony O, Vilchèze C, Arai M, et al. Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli, Antimicrob Agents Chemother, 2007: 51: 752-754
- Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. Epidemiology and Infection, 2003: 130: 239-249.
- Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. J Bacteriol., 2008: (16):5672-5680.
- Καμάρα Αφροδίτη, "Hippocrates", 2006, Εγκυκλοπαίδεια Μείζονος Ελληνισμού, Μ. Ασία ΚΕΕΛΠΝΟ, Η επιδημιολογική εικόνα της Φυματίωσης στην Ελλάδα Επιδημιολογικά Δεδομένα 2004 – 2015, 2015.
- Ράπτης Α.Σ. Εσωτερική Παθολογία. 1ος Τόμος. 2η Έκδοση. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισινού Α.Ε. 2008: ISBN: 960394418