

TOMASZ JAGIELSKI

Zakład Mikrobiologii Stosowanej  
Instytut Mikrobiologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski  
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
E-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

## LEKOOPORNOŚĆ W GRUŻLICY – ASPEKTY MIKROBIOLOGICZNE I KLINICZNE<sup>1</sup>

### WPROWADZENIE

Gruźlica należy do najstarszych chorób towarzyszących człowiekowi. Badania osteoarcheologiczne wykazały jej obecność w Europie epoki neolitu (ok. 5000 p.n.e.), starożytnym Egipcie (ok. 2500–1000 p.n.e.) i Ameryce prekolumbijskiej (ok. 1000 p.n.e.) (JAGIELSKI i współaut. 2010a). Niedawne badania powiązały początki gruźlicy z wielką migracją ludności prehistorycznej poza kontynent afrykański (ok. 70.000 p.n.e.). Na przestrzeni wieków, żadna inna choroba zakaźna nie zabiła tylu ludzi, co gruźlica. Na przełomie XVIII i XIX w., kiedy choroba osiągnęła swoje apogeum, była przyczyną śmierci co czwartego mieszkańca Europy. Tylko w ciągu tych dwóch stuleci, na gruźlicę zmarł ponad miliard ludzi (JAGIELSKI i współaut. 2010a, HARRIS 2013). Tę niechlubną pozycję lidera w rankingu najbardziej śmiertelnych chorób zakaźnych gruźlica utrzymuje do dzisiaj. Każdego roku na świecie umiera z jej powodu ok. 1,5 mln ludzi (średnio 1 zgon co 20 sekund), w tym blisko 140.000 dzieci. Jednocześnie, ogólną liczbę chorych na gruźlicę szacuje się co roku na ok. 13 mln ludzi, z czego niemal 10 mln to chorzy nowowykryci (WHO 2015). Za tak niekorzystne wskaźniki epidemiologiczne gruźlicy w znacznej mierze odpowiadają dwa zjawiska. Pierwsze, to trwająca już czwartą dekadę, globalna ekspansja HIV. Współistnienie zakażenia HIV i gruźlicy zwy-

kle nasila proces chorobowy, zarówno w odniesieniu do gruźlicy, jak i zakażenia wirusowego, istotnie komplikuje przebieg leczenia i pogarsza rokowania. U osób zakażonych HIV ryzyko zachorowania na gruźlicę jest 26 razy większe aniżeli u osób HIV-seronegatywnych. Gruźlica jest też główną przyczyną zgonów wśród osób z HIV/AIDS (WHO 2015). Drugim zjawiskiem, które znacząco negatywnie wpływa na sytuację epidemiologiczną gruźlicy jest lekooporność wywołujących ją szczepów bakteryjnych, prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*). To właśnie coraz częściej notowane przypadki gruźlicy lekoopornej i gruźlicy powikłanej zakażeniem HIV na przełomie lat 80. i 90. ub. w. doprowadziły do załamania się systemu kontroli, nadwątlonego już wcześniej zaniechaniami, wynikającymi z przedwczesnego przekonania o wygranej walce z chorobą. Dramatycznie pogarszające się wskaźniki epidemiologiczne skłoniły Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) do podjęcia radykalnych działań. Pierwszym było ogłoszenie, w 1993 r., gruźlicy jako zagrożenia dla zdrowia ludności w skali globalnej (WHO 1994). Od tamtego czasu zaczęto odbudowywać krajowe i regionalne programy zwalczania gruźlicy, a w ich ramach powiększać i doskonalić infrastrukturę laboratoriów i szpitali gruźliczych, opracowywać nowe algorytmy diagnostyczne i schematy leczenia, prowadzić rygorystyczną sprawozdawczość i monitorowanie sytuacji epidemiologicznej

**Słowa kluczowe:** gruźlica, leki przeciwaprątkowe, lekooporność, mutacje, *Mycobacterium tuberculosis*

<sup>1</sup>Artykuł powstał przy wsparciu finansowym ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, w ramach projektu badawczego «LIDER» (Nr: LIDER/044/457/L-4/12/NCBR/2013).

gruźlicy, a w końcu intensywnie propagować wiedzę na temat choroby, jej zagrożeń, ogólnych zasad leczenia i profilaktyki. Jedną z pierwszych, wypracowanych jeszcze w latach 90. ubiegłego wieku, kompleksowych strategii zwalczania gruźlicy była strategia DOTS, czyli leczenia krótkoterminowego, bezpośrednio nadzorowanego (ang. directly observed treatment short-course). Wytyczne DOTS, wśród których najważniejsze to regularne przyjmowanie leków pod nadzorem i ściśle monitorowanie wyników leczenia badaniami bakteriologicznymi, na trwałe wpisały się do wszystkich programów zwalczania gruźlicy. Największym jest w ostatnich latach „Globalny plan zatrzymania gruźlicy 2006-2015” (ang. Global Plan to Stop TB 2006-2015), kontynuowany obecnie w ramach strategii „End TB” (ang. End TB Strategy 2016-2035), wdrożonych i promowanych przez działające od 2006 r. i współpracujące z WHO Partnerstwo dla Zatrzymania Gruźlicy (ang. Stop TB Partnership). To systemowe podejście do problemu walki z tą chorobą dało wymierne efekty. Ocenia się, że w latach 2000-2014 dzięki wprowadzeniu skutecznych metod diagnostyki i leczenia gruźlicy, włączając przede wszystkim strategię DOTS, uratowano życie ponad 40 mln ludzi (WHO 2015). Choć wciąż wysokie, wskaźniki chorobowości i umieralności na gruźlicę są teraz niemal o połowę niższe w porównaniu do 1990 r. Co więcej, od 2000 r. utrzymuje się trend zniżkowy w zapadalności na gruźlicę, choć roczne tempo spadku zachorowań jest niewielkie (śr. ok. 1,5%).

Pomimo tych niewątpliwych sukcesów w walce z gruźlicą, pozostaje ona wciąż jednym z największych problemów zdrowotnych populacji ludzkiej. Przy tym skala problemu jest różna w różnych regionach świata, o czym wybitnie świadczą współczynniki zapadalności. O ile w Europie Zachodniej, Ameryce Północnej czy Australii zapadalność na gruźlicę nie przekracza 10 przypadków na 100.000 osób, to w wielu krajach południowoazjatyckich czy Afryki subsaharyjskiej, nowych zachorowań na gruźlicę jest 20-30 razy więcej. Szczególnie dramatyczna sytuacja jest w krajach takich jak Mozambik czy Republika Południowej Afryki, gdzie wskaźnik zapadalności przekracza, odpowiednio 500 i 800 (!) zachorowań na 100.000 ludności. Kontrasty w epidemiologii gruźlicy widać także we wskaźnikach umieralności. Jeśli dla Europy i obu Ameryk wynoszą one, odpowiednio 3,7/100.000 i 1,7/100.000, to dla regionu Azji Południowo-Wschodniej już 24/100.000, a dla Afryki 46/100.000 (WHO 2015).

Jak wspomniano wcześniej, jednym z najważniejszych czynników podsycających

globalną epidemię gruźlicy jest lekooporność prątków. Przy tym, zjawisko lekooporności może przybierać różne formy. Oporność prątków gruźlicy może dotyczyć jednego, dwóch lub więcej leków; może mieć charakter naturalny („wrodzony”) lub nabyty, a jeśli nabyty, to może występować w przypadkach nowo wykrytych, wcześniej nie leczonych (lekooporność pierwotna) lub nawrotach choroby, po co najmniej jednym odbytym kursie leczenia (lekooporność wtórna). Oporność naturalna prątków jest cechą stałą i wynika najczęściej ze specyficznej budowy ich ściany komórkowej, uniemożliwiającej penetrację leku do wnętrza komórki i jego skuteczne działanie. Z kolei oporność nabyta rozwija się w szczepach, które początkowo wykazywały wrażliwość na dany lek. Lekooporność nabyta wtórna jest efektem nieprawidłowego leczenia, zaś lekooporność pierwotna pochodzi głównie z transmisji lekoopornych szczepów prątków. Większe znaczenie przypisuje się lekooporności pierwotnej, gdyż ilustruje ona rzeczywistą dynamikę szerzenia się gruźlicy lekoopornej, będąc, pośrednio, problemem skuteczności nadzoru epidemiologicznego (JAGIELSKI i współaut. 2010b).

## ŹRÓDŁA LEKOOPORNOŚCI

Najwcześniejsze dane na temat gruźlicy lekoopornej pochodzą z 1947 r. Opisano wówczas szczepy *Mycobacterium tuberculosis* odporne na streptomycynę (SM), pierwszy lek przeciwprątkowy, wprowadzony do użytku ledwie rok wcześniej. Podobnie, niedługo po tym, jak do leczenia gruźlicy włączono izoniazyd (INH) i kwas *para*-aminosalicylowy (PAS), zaczęto izolować szczepy prątków odporne na te leki. Pojawienie się nowych wzorów lekooporności prątków towarzyszyło wprowadzaniu do leczenia gruźlicy kolejnych chemioterapeutyków. Przy tym, wraz z powiększaniem się arsenału leków przeciwprątkowych i coraz częstszym stosowaniem leczenia skojarzonego, obok szczepów opornych na pojedyncze leki, zaczęto izolować także szczepy wielolekooporne.

U prątków gruźlicy występuje zarówno lekooporność naturalna, jak i nabyta. Przykładem tej pierwszej jest wysoka oporność na większość antybiotyków  $\beta$ -laktamowych. Jest to wynikiem współdziałania co najmniej dwóch mechanizmów: produkcji  $\beta$ -laktamaz i ograniczonej przepuszczalności osłon komórkowych.

Z klinicznego i epidemiologicznego punktu widzenia, największe znaczenie ma jednak lekooporność nabyta. Jej źródłem są spontaniczne mutacje w genach chromosomowych kodujących białka będące często, choć nie zawsze, celami molekularnymi le-

ków. Inaczej niż wiele innych bakterii, prątki nie nabywają lekooporności w drodze tzw. horyzontalnego transferu genów, z udziałem mobilnych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, transpozony czy integrony.

Mutacje genetyczne prowadzące do rozwoju lekooporności w szczepach *M. tuberculosis* mają zwykle charakter punktowy lub niewielkich (kilkunukleotydowych) insercji lub delecji. Prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji skutkującej fenotypem lekoopornym jest różne dla poszczególnych leków i wprost proporcjonalne do wielkości populacji bakteryjnej. Na przykład, dla INH, mutacje opornościowe pojawiają się w 1 na  $10^6$  komórek bakteryjnych. W wypadku rifampicy (RMP), mutanty odporne na ten lek pojawiają się z częstością  $1/10^8$ . Jako że mutacje opornościowe nie są ze sobą sprzężone, występują niezależnie od siebie, prawdopodobieństwo rozwoju mutantów opornych równocześnie na INH i RMP wynosi  $1/10^{14}$ . Nawet w tych obszarach anatomicznych, gdzie prątki występują najliczniej (np. w jamach gruźliczych), ich populacja nie przekracza  $10^7$ - $10^9$ , a to wyklucza możliwość powstania spontanicznych, podwójnych mutantów opornościowych (SHARMA i MOHAN 2006). Jak zatem tłumaczyć występowanie takich szczepów prątków? Kluczową rolę w rozwoju lekooporności nabytej, w tym lekooporności złożonej, w prątkach odgrywa proces selekcji, czyli przesunięcia proporcji komórek opornych względem wrażliwych na dany lek przeciwprątkowy. Dzieje się tak w wyniku niedostatecznego hamowania wzrostu prątków przez leki. To z kolei ma miejsce wówczas, gdy stosowana jest monoterapia, leki podawane są w zbyt niskich dawkach, stan chorego lub jakość leków obniża ich biodostępność, czy też gdy chory przerywa leczenie, gdy tylko przyjdzie poprawa samopoczucia lub z powodu pojawienia się objawów niepożądanych. Jeśli więc w leczeniu chorego na gruźlicę wystąpi któryś z wymienionych czynników selekcyjnych, lekooporne formy prątków zaczną szybko wypierać formy lekowrażliwe, a dany lek straci swój efekt terapeutyczny. Jeśli do leczenia gruźlicy, w której prątki już wykazują oporność na jeden lek, wprowadzi się kolejny preparat, to w wypadku zaistnienia podobnych jak wcześniej nieprawidłowości w jego stosowaniu, może dojść do wyselekcjonowania mutantów opornych także na ten drugi lek. Lekooporność złożona w gruźlicy rozwija się więc stopniowo i niemal zawsze jest wynikiem powielanych nieprawidłowości w leczeniu, za które odpowiada lekarz (monoterapia, nieprawidłowy dobór dawek),

ale częściej chory (niesystematyczne przyjmowanie leków, samowolne przerywanie leczenia) (MITCHISON i DAVIES 2012).

W ostatnich latach coraz częściej podnosi się znaczenie mechanizmów epigenetycznych w nabywaniu lekooporności przez prątki gruźlicy. Chodzi tu o zmiany poziomu ekspresji genów czy potranslacyjne modyfikacje białek, indukowane czynnikami podobnymi do tych, które ułatwiają selekcję mutantów opornościowych. Przykładem nabywania takiej lekooporności fenotypowej jest zwiększona ekspresja genów kodujących białka o właściwościach pomp (ang. efflux pumps), które rozpoznają określone leki i usuwają je z cytoplazmy komórki bakteryjnej na zewnątrz. Mechanizm ten zaobserwowano między innymi w szczepach prątków ekspozycyjnych na wzrastające stężenia INH (MACHADO i współaut. 2012). To właśnie działaniu mechanizmów epigenetycznych przypisuje się oporność na leki w szczepach prątków pozbawionych typowych mutacji opornościowych. Choć wykształcona w ten sposób cecha lekooporności jest niestabilna i może podlegać rewersji, ułatwia prątkom nabywanie lekooporności trwałej, mutacyjnej.

Najprawdopodobniej oporność prątków na leki, w tym przede wszystkim oporność złożona, jest wypadkową działania, niekoniernie równocennego, zarówno mutacji, jak i mechanizmów pozagenetycznych.

## EPIDEMIOLOGIA GRUŻLICY LEKOOPORNEJ

W odpowiedzi na światowy kryzys w epidemiologii gruźlicy lat 90., w wielu krajach wznowiono lub uruchomiono po raz pierwszy narodowe programy monitorowania gruźlicy lekoopornej. Od 1994 r. WHO wraz z Międzynarodową Unią do Walki z Gruźlicą i Chorobami Płuc (ang. International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases, IUATLD) zaczęły scalać je w światowy program nadzoru gruźlicy lekoopornej (ang. Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance, DRS). Ideą programu było nie tylko stworzenie jednej, centralnej bazy danych epidemiologicznych dotyczących gruźlicy lekoopornej, ale też opracowanie i wdrożenie jednolitych wytycznych metodycznych w zakresie zbierania, przetwarzania i analizy danych w poszczególnych krajach. Chodziło o zapewnienie możliwie największej powtarzalności i porównywalności wyników między różnymi krajami, a nawet laboratoriami w tym samym kraju. W tym celu powołano eksperckie grupy robocze, utworzono krajowe i międzynarodowe laboratoria referencyjne, wydano szereg instrukcji, zaleceń i protokołów, a także wprowadzono wiele pro-

cedur kontrolnych i walidacyjnych. Wyniki programów DRS, publikowane regularnie w postaci raportów, stały się podstawą do weryfikacji dotychczasowych lub proponowania nowych strategii interwencyjnych, zapobiegających rozprzestrzenianiu się szczepów opornych i zwiększających skuteczność leczenia chorych na tę postać gruźlicy (JAGIELSKI i współaut. 2010b).

Według ostatniego raportu WHO/IU-ATLD, podsumowującego wyniki czwartej edycji programu DRS, udział gruźlicy lekoopornej wśród chorych nowo wykrytych był najmniejszy w krajach Europy Zachodniej (śr. 7,9%), zaś największy w republikach postradzieckich, takich jak Gruzja (49%), Mołdawia (43%) czy Ukraina (40%). Podobnie, skrajne odsetki lekooporności w gruźlicy wśród chorych wcześniej leczonych, rozpięte były między krajami Europy Wschodniej (ściślej WNP i kraje bałtyckie) i Zachodniej (śr. 62,8% vs. 17,8%) (WHO 2008).

W oparciu o dane pochodzące ze wszystkich czterech dotychczasowych edycji programu DRS (1994–2007) obliczono, że oporność na leki dotyczyła piątej części wszystkich analizowanych przypadków gruźlicy. Wśród chorych nowo wykrytych i wcześniej leczonych, odsetek przypadków gruźlicy opornej na co najmniej 1 lek przeciwprątkowy wynosił, odpowiednio 17% i 35%. Rozpatrując udział poszczególnych leków we wzorach lekooporności prątków wykazano, że najczęściej występowała oporność na INH (śr. 13,3%), dalej na SM (12,6%), RMP (6,3%) i etambutol (EMB; 3,9%) (WHO 2008, JAGIELSKI i współaut. 2010b).

W sprawozdawczości epidemiologicznej gruźlicy niezwykle ważne są meldunki dotyczące gruźlicy wielolekoopornej. Jest tak dlatego, że wielolekooporność prątków stanowi największe zagrożenie dla systemu leczenia i nadzoru nad gruźlicą. Szczególnie znaczenie ma oporność typu MDR (ang. multidrug resistance), definiowana jako oporność prątków na co najmniej INH i RMP, dwa kluczowe leki stosowane w terapii gruźlicy. Pierwsze doniesienia o występowaniu gruźlicy typu MDR pochodziły z przełomu lat 80. i 90. ubiegłego wieku i miały charakter raczej sporadyczny. Dopiero w połowie lat 90. zaobserwowano nagły wzrost zachorowań na gruźlicę typu MDR w Europie i Stanach Zjednoczonych. Odnotowane wówczas przypadki, głównie wśród pacjentów oddziałów szpitalnych i osób zakażonych HIV, cechował gwałtowny przebieg choroby, wysoka śmiertelność (ponad 80%), a także szybkość i łatwość transmisji zakażenia (YEW i CHAU 1995). To właśnie wzrost częstości występień gruźlicy typu MDR, był jedną z głównych przyczyn załamania się w końcu ubie-

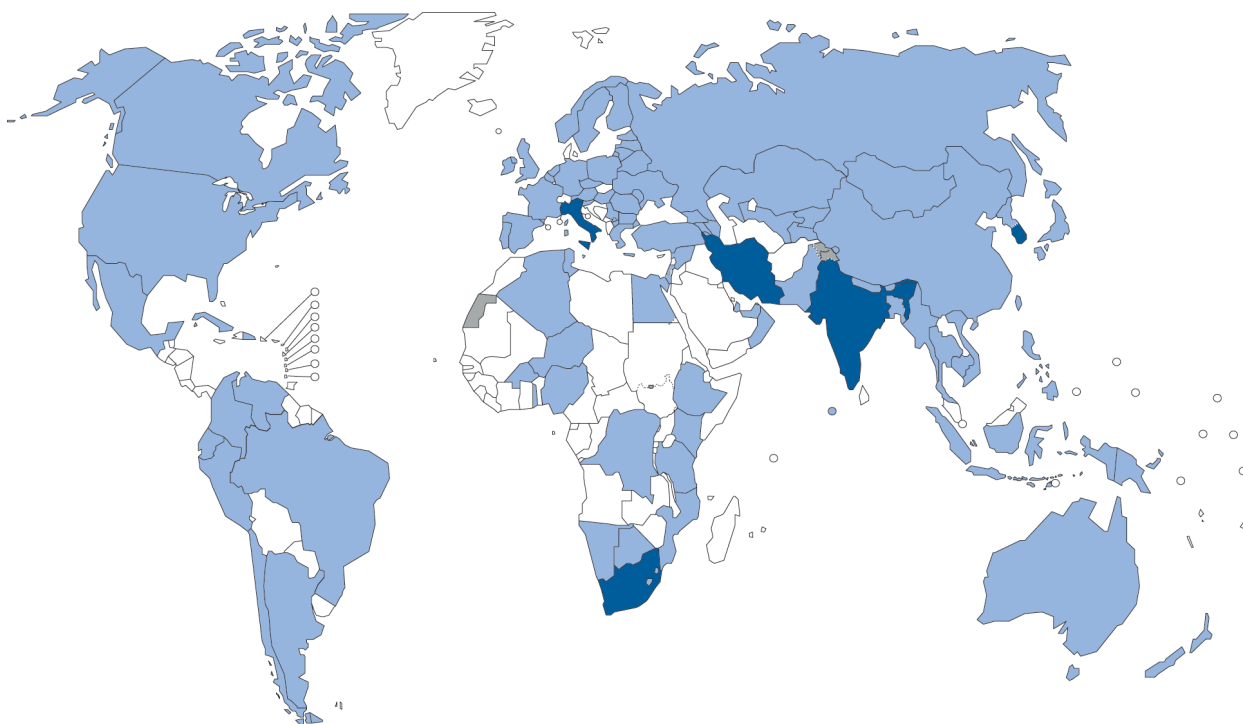
głego wieku sytuacji epidemiologicznej gruźlicy w świecie.

Jak wynika z przytoczonego już raportu WHO/IUATLD, w latach 1994–2007, gruźlica typu MDR stanowiła 5% wszystkich notowanych przypadków gruźlicy. Jednocześnie występowała ona 5-krotnie częściej w grupie chorych wcześniej leczonych, aniżeli w grupie chorych nowo wykrytych (15% vs. 3%). Najbardziej aktualne dane dotyczące występowania gruźlicy typu MDR przedstawia coroczny raport WHO o sytuacji epidemiologicznej w świecie (WHO Global TB Report). I tak, w 2014 r. odnotowano 480.000 przypadków gruźlicy typu MDR oraz 190.000 zgonów z jej powodu. Odsetek chorych z lekoopornością prątków MDR wśród chorych nowo wykrytych i wcześniej leczonych obliczono, odpowiednio na 3,3% i 20% (WHO 2015). Rozkład geograficzny zapadalności na gruźlicę typu MDR nie zmienia się od lat. Najwięcej zachorowań notuje się w krajach Europy Wschodniej (Białoruś, Ukraina, Estonia) i Azji Środkowej (Kazachstan, Kirgistan, Uzbekistan). Tutaj, lekooporność prątków MDR dotyczy co piątego chorego nowo wykrytego i co drugiego chorego wcześniej leczonego (WHO 2015). W krajach rozwiniętych, takich jak Stany Zjednoczone, Kanada czy Izrael, istotny udział w gruźlicy typu MDR mają przypadki wśród imigrantów (JAGIELSKI i współaut. 2010b).

W 2006 r. opisano pierwsze przypadki gruźlicy, w której prątki były oporne nie tylko na INH i RMP, ale także na inne leki z grupy aminoglikozydów czy fluorochinolonów. Ten typ oporności nazwano XDR (ang. extensively drug resistance), precyzując jego definicję jako oporność typu MDR z jednoczesną opornością na co najmniej jeden lek z grupy fluorochinolonów (np. ofloksacyna, Ofx) oraz jeden lek z grupy leków podawanych parenteralnie (np. amikacyna, Am; kapreomycyna, Cm).

Odwołując się ponownie do ostatniego raportu WHO (WHO Global TB Report), w 2014 r. gruźlicę typu XDR odnotowano w 105 krajach (Ryc. 1). Stanowiła ona 9,7% wszystkich przypadków gruźlicy typu MDR w tym samym roku. Przy tym, prewalencja gruźlicy typu XDR była największa w krajach o najwyższych wskaźnikach zapadalności na gruźlicę typu MDR. Szczególnie wysoki udział oporności XDR w zachorowaniach na gruźlicę typu MDR wykryto na Białorusi (29%), Litwie (25%), Łotwie (19%) i Gruzji (15%) (WHO 2015).

W ostatnich latach zwrócono uwagę na jeszcze inny rodzaj oporności prątków. W 2007 r. opisano we Włoszech przypadki gruźlicy, w których szczepy *M. tuberculosis* wykazywały oporność na wszystkie dostęp-



Ryc. 1. Gruźlica wielolekooporna w świecie. Kraje, w których odnotowano co najmniej 1 przypadek gruźlicy typu XDR i/lub TDR oznaczono kolorem, odpowiednio – niebieskim i granatowym. Kolorem białym oznaczono kraje, w których nie odnotowano przypadków gruźlicy XDR, zaś kolorem szarym oznaczono kraje, które nie przedstawiły danych dotyczących występowania gruźlicy XDR.

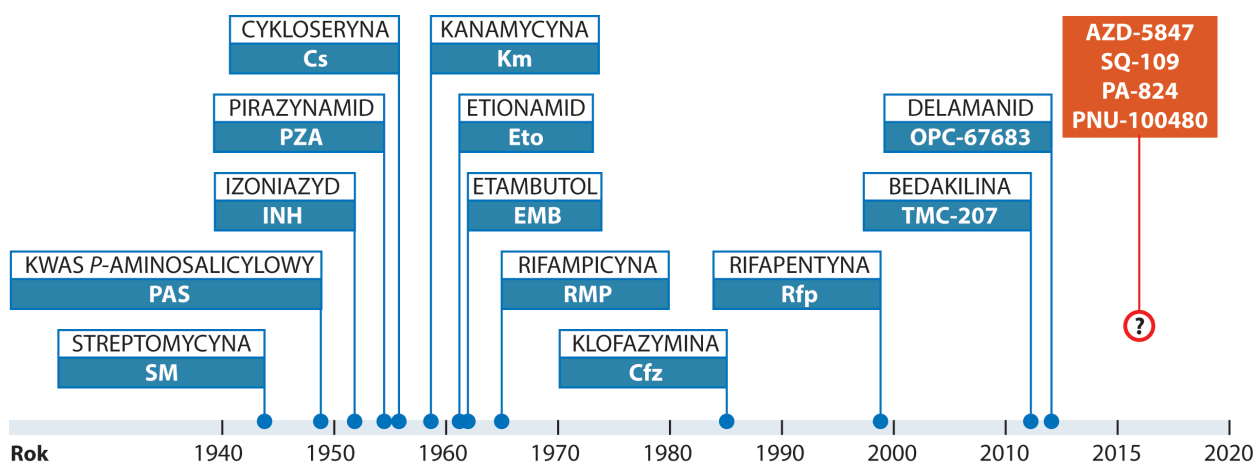
ne leki I i II wyboru (MIGLIORI i współaut. 2007). Podobne przypadki gruźlicy, z opornością prątków na wszystkie leki I wyboru i wszystkie lub większość dostępnych leków II wyboru odnotowano w Iranie (VELAYATI i współaut. 2009), Indiach (UDWADIA i współaut. 2012) i Republice Południowej Afryki (KLOPPER i współaut. 2013) (Ryc. 1). Dla tego typu oporności zaproponowano dotąd dwa oznaczenia, tj. XXDR (ang. extremely drug resistance) lub TDR (ang. totally drug resistance). Wciąż jednak brak precyzyjnej definicji takiej oporności. Nie ustalono bowiem ściśle jakich leków, głównie spośród leków II wyboru, ma ona dotyczyć; czy tylko tych dopuszczonych przez WHO do leczenia gruźlicy, czy także tych o wątpliwej, niepotwierdzonej aktywności przeciwprątkowej? Co więcej, w przypadku wielu spośród leków II wyboru, nadal nie ma wystandaryzowanych metod oznaczania lekowrażliwości ani też ustalonych stężeń krytycznych, definiujących stan oporności na dany lek.

Chociaż w Polsce zjawisko oporności prątków na leki rozpoznano już w pierwszych latach chemioterapii przeciwgruźliczej, badania epidemiologiczne w tym zakresie miały zwykle charakter wyrwykowy i lokalny. Dopiero od 1997 r., kiedy Polska przystąpiła do międzynarodowego programu DRS, badanie lekooporności w gruźlicy re-

alizowane jest w skali ogólnokrajowej, systematycznie, co 2-3 lata, ściśle według organizacyjnych i metodycznych zaleceń WHO (JAGIELSKI i współaut. 2010b). We wszystkich czterech dotychczas przeprowadzonych badaniach, lekooporność wtórna występowała z namiernie częściej niż lekooporność pierwotna. Podobną prawidłowość obserwowano w przypadku lekooporności typu MDR. Uwagę zwraca fakt, że liczba przypadków gruźlicy typu MDR w ostatnim czasie niepokojąco wzrosła; jeśli w 2004 r. odnotowano ich 51, to w 2008 r. już niemal dwukrotnie więcej (97). Znacząco przybyło również chorych wydalających prątki o oporności typu XDR. O ile w latach 1997-2000 wykryto tylko jeden szczerp spełniający kryteria oporności typu XDR, to w latach 2004-2009 wyizolowano 18 takich szczepów (KOZIŃSKA i współaut. 2011).

#### CHARAKTERYSTYKA LEKÓW PRZECIWPRAŃKOWYCH. MOLEKULARNE PODSTAWY LEKOOPORNOŚCI

Arsenał leków przeciwprątkowych jest niemały, choć większość spośród nich to leki stare, stosowane w leczeniu gruźlicy od ponad pół wieku (Ryc. 2). Zgodnie z klasyfikacją WHO, leki przeciwprątkowe dzieli



Ryc. 2. Kalendarium wprowadzania leków przeciwprątkowych do terapii gruźlicy. W pomarańczowej ramce wymieniono leki nowej generacji będące w II fazie badań klinicznych.

się na pięć grup, w zależności od ich użyteczności w leczeniu. Największą mają leki I grupy, nazywane lekami I rzutu (wyboru). Leki z grup II-V, z uwagi na mniejszą skuteczność, za to większą toksyczność dla pacjentów, określa się jako tzw. leki II rzutu (Tabela 1).

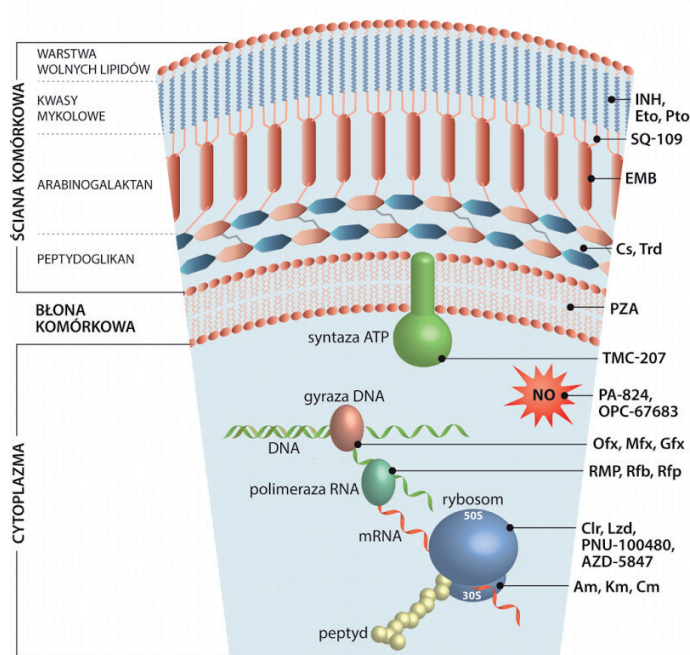
Poniżej podano charakterystykę najważniejszych leków przeciwprątkowych, reprezentujących poszczególne grupy, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów działania i oporności na te leki (Ryc. 3).

#### LEKI I RZUTU – I GRUPA

IZONIAZYD (INH) lub hydrazyd kwasu izonikotynowego (4-pirydynokarboksyłowego) jest najstarszym lekiem przeciwprątkowym. Otrzymany w wyniku syntezy chemicznej w 1912 r., do leczenia gruźlicy został włączony dopiero 40 lat później, bo dopiero wtedy wykazano jego aktywność przeciwprątkową. INH należy do najsilniejszych leków przeciwprątkowych. Działa bakteriobójczo, i w mniejszym stopniu bakteriostatycznie, na prątki znajdujące się wewnątrz makrofa-

Tabela 1. Klasyfikacja leków przeciwprątkowych stosowanych w terapii gruźlicy.

	Grupa	Opis	Nazwa leku (skrót)
LEKI I RZUTU	I.	Leki doustne I rzutu	izoniazyd (INH)
			rifampicyna (RMP)
			pirazynamid (PZA)
LEKI II RZUTU	II.	Parenteralne leki przeciwprątkowe (PLP)	streptomycyna (SM)
			kanamycyna (Km)
			amikacyna (Am)
LEKI II RZUTU	III.	Fluorochinolony (FQ)	kapreomycyna (Cm)
			ofloksacyna (Ofx)
			lewofloksacyna (Lfx)
LEKI II RZUTU	IV.	Leki doustne II rzutu	moksyfloksacyna (Mfx)
			gatyfloksacyna (Gfx)
			etionamid (Eto)
			protionamid (Pto)
			cykloseryna (Cs)
LEKI II RZUTU	V.	Leki o niepotwierdzonej skuteczności	teryzyd (Trd)
			kwas p-aminosalicylowy (PAS)
			klofazymina (Cfz)
			klarytromycyna (Clr)
			linezolid (Lzd)
			tioacetazon (Thz)



Ryc. 3. Molekularne cele działania ważniejszych leków przeciwprątkowych stosowanych w terapii gruźlicy.

gów i pozakomórkowo, ale niemal wyłącznie będące w logarytmicznej fazie wzrostu (intensywnych podziałów). INH wykazuje aktywność wobec różnych gatunków prątków, ale wybitnie wrażliwe na działanie leku są prątki kompleksu *M. tuberculosis*. Minimalne stężenie hamujące (ang. minimal inhibitory concentration, MIC) INH dla tych prątków zwykle nie przekracza 0,05 mg/L (MUSSEY 1995).

Molekularne mechanizmy działania INH wciąż nie są dokładnie znane. Przyjmuje się, że INH jest prolekiem, który po wnikięciu do komórki prątka jest utleniany przy pomocy enzymu katalaza-peroksydaza (KatG) do farmakologicznie aktywnych pochodnych. Te z kolei tworzą addukty z cząsteczkami koenzymu  $NAD^+$  lub  $NADP^+$  i razem działają jako inhibitory enzymów prątkowych, takich jak reduktaza enoilo-ACP (InhA) czy syntaza  $\beta$ -ketoacylo-ACP (KasA). Enzymy te są składnikami układu enzymatycznego FAS (ang. fatty acid synthase) II, uczestniczącego w biosyntezie kwasów mykoloowych, współtworzących ścianę komórkową prątków (TIMMINS i DERETIC 2006).

INH dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, metabolizowany jest w wątrobie i wydalany przez nerki. Jest lekiem dobrze tolerowanym i rzadko powoduje działania uboczne. Najczęściej występują objawy uszkodzenia wątroby. Czasem zdarza się zapalenie nerwów obwodowych (polineuropatia), a to dlatego, że INH jest antymetabolitem pirydoksyny.

Badania genetycznej determinacji oporności na INH w szczepach *M. tuberculosis* doprowadziły do wykrycia wielu mutacji, w różnych genetycznych loci, które w różny sposób kształtują lekooporny fenotyp prątków (Tabela 3). Najczęściej, bo aż u 50–95% szczepów INH-opornych występują mutacje w genie *katG*, kodującym białko katalazy-peroksydazy. Mutacje te prowadzą do zniesienia lub istotnego ograniczenia aktywności peroksydazowego enzymu, a przez to zdolności aktywowania INH.

Oporność prątków na INH może rozwinąć się także jako efekt mutacji w genach kodujących białka będące bezpośrednimi celami działania leku. I tak np., w szczepach INH-opornych stosunkowo często (u ok. 20–35% takich szczepów) występują mutacje w promotorze genu *inhA*, prowadząc do wzmożonej jego ekspresji. Ponadfizjologiczny poziom białka powoduje przełamanie jego blokady cząsteczkami INH i regenerację jego enzymatycznej funkcji. Nieco rzadziej obserwuje się mutacje strukturalne, tj. w obrębie sekwencji kodującej genu *inhA*. Mutacje te skutkują przebudową miejsca aktywnego enzymu w taki sposób, że niemożliwe staje się przyłączenie adduktów INH-NAD/NADP (RISKA i współaut. 2000).

Wśród innych genów, w których mutacje wiążą się z rozwojem INH-oporności są: *ndh*, kodujący dehydrogenazę NADH, która zwiększając wewnątrzkomórkową pulę  $NAD^+$  ułatwia aktywację INH, *nhoA*, kodujący N-acetylotrasferazę arylamin (NAT), enzym inaktywujący INH, czy *furA*, kodujący białko negatywnego regulatora transkrypcji *katG* (JAGIELSKI 2010).

RIFAMPICYNA (RMP) jest, obok INH, najsilniejszym lekiem przeciwprątkowym. Jest półsyntetyczną pochodną rifamycyny B, antybiotyku wyizolowanego z hodowli *Amycolatopsis* (d. *Streptomyces*) *mediterranei* jeszcze w latach 50. ubiegłego wieku. Spośród całej grupy rifamycyn, RMP posiada największą aktywność przeciwprątkową; wartość MIC leku dla prątków gruźlicy wynosi średnio 0,06–0,25 mg/L. To właśnie wprowadzenie RMP do leczenia gruźlicy w końcu lat 60. nie tylko znacząco skróciło czas trwania terapii (z 18-24 miesięcy przy leczeniu skojarzonym INH, SM i PAS, do 9 miesięcy wg schematu łączącego INH, RMP i SM), ale też poprawiło jej wyniki.

Inaczej niż w wypadku INH, RMP charakteryzuje się szerokim spektrum działania. Oprócz prątków kompleksu *M. tuberculosis*, RMP ma wysoką aktywność wobec prątków

trađu (*Mycobacterium leprae*) i tzw. prątków atypowych, takich jak *Mycobacterium avium* czy *M. kansasii*, wywołujących oportunistyczne zakażenia u ludzi (gł. układu oddechowego). Ponadto, RMP jest skuteczna wobec Gram-dodatnich paciorkowców i gronkowców, a także Gram-ujemnych ziarniaków (np. *Neisseria meningitidis*) i pałeczek, takich jak *Haemophilus influenzae*, a jeszcze bardziej *Legionella pneumophila* (MIC<0,5 mg/L) (MASŁOW i PORTAL-CELHAY 2015).

RMP ma działanie wybitnie bakteriobójcze, które wywiera na prątki zlokalizowane zarówno wewnątrz-, jak i pozakomórkowo, i to bez względu na ich aktywność metaboliczną (efekt wyjaławiający). Podobnie jak wszystkie rifamycyny, RMP jest inhibitorem syntezy RNA. Na poziomie molekularnym, lek wiąże się swoim pierścieniem makrocyklicznym z podjednostką  $\beta$  DNA-zależnej polimerazy RNA (ang. DNA-dependent RNA polymerase, RNAP), hamując jej aktywność transkrypcyjną. Wraz z blokadą transkrypcji dochodzi do zahamowania syntezy białek. RMP jest lekiem dobrze wchłanianym z przewodu pokarmowego. Podlega transformacji metabolicznej w wątrobie i wydalaony jest głównie z kałem. RMP działa przede wszystkim hepatotoksycznie, przy czym objawy uboczne obserwuje się głównie u chorych przewlekle prątkujących

Za oporność prątków na RMP odpowiadają niemal wyłącznie mutacje w pojedynczym locus, tj. genie *rpo $\beta$* , kodującym podjednostkę  $\beta$  bakteryjnej polimerazy RNA. Ogromna większość tych mutacji lokuje się w niewielkim fragmencie genu, liczącym 81 par zasad, który określa się jako „gorące miejsce” (ang. hot spot) mutacji lub RRDR (ang. RMP-resistance determining region). Mutacje w genie *rpo $\beta$*  obserwuje się u ponad 95% szczepów klinicznych *M. tuberculosis* opornych na RMP (MASŁOW i PORTAL-CELHAY 2015).

Szczepy prątków oporne na RMP są zwykle oporne także na inne antybiotyki rifamycynowe, takie jak rifabutina (Rfb) czy rifapentyna (Rfp). Zjawisko krzyżowej oporności wynika przede wszystkim ze wspólnego mechanizmu działania tych leków.

Niezwykle ważny z diagnostycznego punktu widzenia jest fakt, że oporności prątków gruźlicy na RMP towarzyszy niemal zawsze jednoczesna oporność na INH. Stąd, wykrycie RMP-oporności wskazuje od razu na fenotyp MDR. Zależność tę tłumaczy się tym, że mutacje warunkujące oporność na INH występują 100-krotnie częściej niż te prowadzące do RMP-oporności. Jeśli więc w populacji prątków wykrywa się oporność na RMP, to istnieje duże prawdopodobieństwo,

że populację wyjściową stanowiły mutanty INH-oporne.

**PIRAZYNAMID** (PZA) należy do najważniejszych leków przeciwprątkowych, stosowanych łącznie z INH, RMP i EMB. Użycie PZA w takiej kombinacji, po raz pierwszy w latach 70. ub. w., pozwoliło skrócić czas leczenia gruźlicy lekowrażliwej z 9 do 6 miesięcy. Schemat włączający te trzy leki jest do dziś podstawą leczenia gruźlicy, szczególnie w jego intensywnej fazie (Tabela 2). PZA jest syntetyczną pochodną kwasu nikotynamidowego. Dokładny mechanizm działania leku nie jest znany. Wiadomo, że PZA, podobnie jak INH, jest prolekiem, który w komórce prątka ulega przekształceniu do formy farmakologicznie czynnej. Aktywacja PZA polega na jego deaminacji z udziałem prątkowego enzymu pirazynamidazy, z wytworzeniem kwasu pirazyнового (ang. pyrazinoic acid, POA). Wciąż nie ustalono molekularnych celów działania PZA i jego aktywnego metabolitu, POA. Wydaje się, że wywiera on efekt pleiotropowy. W formie uprotonowanej (HPOA) zaburza potencjał błonowy komórki bakteryjnej, a jego akumulacja w cytoplazmie prowadzi do drastycznego obniżenia pH, co najprawdopodobniej upośledza wiele szlaków enzymatycznych (m.in. związanych z biosyntezą kwasów tłuszczowych), a także funkcje transportu błonowego.

Za oporność prątków na PZA odpowiadają najczęściej mutacje w genie *pncA* kodującym enzym pirazynamidazy. Fenotypowym efektem mutacji jest utrata przez komórkę aktywności pirazynamidazy, przez co PZA nie może ulec przekształceniu do swojej czynnej formy. Mutacje w genie *pncA*, rozproszone na całej długości genu, a także regionu promotorowego, występują u 72–99% (średnio 85%) szczepów opornych na PZA.

PZA działa niemal wyłącznie na prątki ludzkie (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*). Prątki bydłce *Mycobacterium bovis* są naturalnie oporne na PZA, przez obecność punktowych mutacji w genie *pncA*. Wartości MIC PZA dla prątków *M. tuberculosis* wynoszą 6–50 mg/L, podczas gdy dla prątków *Mycobacterium smegmatis* czy pałeczek *Escherichia coli* przekraczają 2000 mg/L (ZHANG i MITCHISON 2003). Specyficzność PZA względem prątków *M. tuberculosis* tłumaczy się upośledzoną aktywnością bakteryjnych pomp, usuwających aktywne metabolity leku z komórki. System pomp jest jeszcze mniej wydolny w sytuacji spowolnionego metabolizmu. To dlatego PZA działa przede wszystkim na prątki metabolicznie nieaktywne (ZHANG i współaut. 2014a).

PZA jest dobrze adsorbowany z przewodu pokarmowego, metabolizowany w wątrobie,



Tabela 2. Schematy leczenia gruźlicy lekowrażliwej i lekoopornej.

Oporność	Schemat		Min. czas leczenia [mies.]	
	Faza intensywna	Faza kontynuacji	Faza intensywna	Faza kontynuacji
–	INH+RMP+PZA+EMB/SM	INH+RMP	2	4
INH±SM	RMP+PZA+EMB (+FQ)			6–9
INH+PZA	RMP+EMB+FQ			9–12
INH+EMB	RMP+PZA+FQ			9–12
RMP	INH+PZA <sub>2</sub> +EMB+FQ (+PLP)			12–18
RMP+EMB±SM	INH+PZA+FQ+PLP <sub>2,3</sub>			18
RMP+PZA±SM	INH+EMB+FQ+PLP <sub>2,3</sub>			18
INH+EMB+PZA±SM	RMP+FQ+SLDo+PLP <sub>2,3</sub>			18
INH+RMP	PZA+FQ+PLP+Eto/Pto+Cs/	PZA+FQ+Eto/Pto-	8	12–18
	PAS	+Cs/PAS		

FQ, fluorochinolon; PLP, parenteralny lek przeciwprątkowy (indeks dolny oznacza min. czas podawania leku w mies.); w nawiasach podano leki, których stosowanie jest opcjonalne; leki rozdzielone ukośnikiem mogą być użyte zamiennie; pozostałe oznaczenia leków podano w tekście.

a wydalany przez nerki. Najpoważniejszym działaniem niepożądanym leku jest hepatotoksyczność.

**ETAMBUTOL** (EMB) to syntetyczny lek przeciwprątkowy, pochodna etylenodiaminy i strukturalny analog arabinozy, który razem z INH, RMP i PZA uzupełnia standardowy, 4-lekowy schemat leczenia gruźlicy w fazie intensywnej (Tabela 2). EMB wywiera działanie bakteriostatyczne na prątki aktywnie rosnące, znajdujące się pozakomórkowo i wewnątrzkomórkowo. Szczególnie wrażliwe na działanie EMB są prątki *M. tuberculosis*, (MIC<5 mg/L), ale lek hamuje także wzrost innych mykobakterii, w tym prątków atypowych (m.in. *M. avium* i *M. kansasii*). Główną funkcją EMB jest zapobieganie powstawaniu oporności prątków na skojarzone z nim leki, głównie INH i RMP.

W wymiarze molekularnym, EMB zaburza syntezę arabinogalaktanu, jednego z integralnych komponentów ściany komórkowej prątków. Ściślej, EMB blokuje enzym transferazę arabinozylową hamując w ten sposób inkorporację D-arabinozy do arabinogalaktanu, a przez to uniemożliwiając właściwe kotwiczenie kwasów mykolowych w ścianie komórkowej.

Oporność prątków na EMB wiąże się z mutacjami w genach tworzących operon *embCAB*, kodujących mykobakteryjne arabinozylotransferazy. Przy tym najczęściej mutacje dotyczą genu *embB*. Występują one u ok. 70% szczepów EMB-opornych (PLINKE i współaut 2006).

EMB wchłania się dobrze z przewodu pokarmowego. Większość leku wydalana jest przez nerki w stanie niezmienionym. Najpoważniejsze efekty uboczne przyjmowania EMB wiążą się z zaburzeniami widzenia, w skrajnych przypadkach prowadząc do utraty wzroku poprzez trwałe uszkodzenie nerwu wzrokowego.

## LEKI II RZUTU

Leki przeciwprątkowe II rzutu należące do grup II–IV mają udokumentowaną aktywność przeciwprątkową, choć jest ona mniejsza niż w wypadku leków podstawowych (grupa I). Leki te (grup II–IV) mają zastosowanie w sytuacjach szczególnych, takich jak nawrót gruźlicy, nietolerancja leków podstawowych, ale przede wszystkim gruźlica lekooporna, w tym gruźlica typu MDR. Przydatność terapeutyczną omawianych leków wyznaczają tolerancja leku i jego skłonność do oporności krzyżowej.

### II grupa

Do grupy tej należą leki podawane pozajelitowo (parenteralnie), które działają bakteriobójczo, głównie na pozakomórkowe populacje prątków. Wśród parenteralnych leków przeciwprątkowych (PLP) są antybiotyki reprezentujące dwie klasy: aminoglikozydy i glikopeptydy.

**AMINOGLIKOZYDY** stosowane w leczeniu gruźlicy to **STREPTOMYCINA** (SM), pierwszy lek przeciwprątkowy, otrzymany ze szczepu *Streptomyces griseus*, **KANAMYCINA** (Km), wyizolowana z hodowli *Streptomyces kanamyceticus* i syntetyczna pochodna Km, **AMIKACYNA** (Am). Wszystkie mają wspólny mechanizm działania, polegający na hamowaniu biosyntezy białek bakteryjnych. Osiągają to wiążąc się swoiście do podjednostki 30S rybosomu, a ściślej tworzących ją białek i cząsteczki 16S rRNA. Oporność prątków na SM jest wynikiem zmian w strukturze rybosomu. Zmiany te wprowadzają najczęściej mutacje w dwóch genach, tj. *rrs* i *rpsL*, kodujących, odpowiednio, 16S rRNA i białko S12, wchodzące w skład małej podjednostki rybosomu (30S) (JAGIELSKI i współaut. 2014). Szczepy prątków odporne na SM zwykle wykazują wrażliwość na Km i Am. Podobnie jak w wypadku SM, mutacje odpowiedzialne

Tabela 3. Genetyczne determinanty oporności prątków *M. tuberculosis* na ważniejsze leki stosowane w terapii gruźlicy.

	Lek (skrót)	MIC [mg/L]	Gen	Produkt
LEKI I RZUTU	INH	0,02–0,05	<i>katG</i>	katalaza/peroksydaza
			<i>inhA</i>	reduktaza enoilo-ACP
			<i>kasA</i>	syntaza β-keto-acylo-ACP
			<i>ndh</i>	dehydrogenaza NADH
			<i>nho</i>	N-acetylotrasferazaarylamin
	RMP	0,06–0,25	<i>ahpC</i>	reduktaza wodoronadtlenkówalkilowych
	PZA	16–100	<i>rpoβ</i>	podjednostka β polimerazy RNA
			<i>pncA</i>	pirazynamidaza
			<i>rpsA</i>	białko rybosomalne S1
	EMB	1–5	<i>panD</i>	dekarboksylaza asparaginianowa
LEKI II RZUTU	SM	2–8	<i>embCAB</i>	arabinozylotransferazy
			<i>rrs</i>	16S rRNA
			<i>rpsL</i>	białko rybosomalne S12
	Am, Km	2–4	<i>gidB</i>	metylotransferaza 16S rRNA
	Cm	2–4	<i>rrs</i>	16S rRNA
			<i>eis</i>	acetylotransferaza aminoglikozydowa
	FQ	0,5–2,5	<i>rrs</i>	16S rRNA
	Eto/Pto	2,5–10	<i>tlyA</i>	2'-O-metylotransferaza rRNA
			<i>gyrA/B</i>	podjednostka α/β gyrazy DNA
			<i>inhA</i>	reduktaza enoilo-ACP
<i>ethA</i>			monooksygenaza flawoproteinowa	
<i>ethR</i>			represor transkrypcji <i>ethA</i>	
Cs/Trd	10–40	<i>ndh</i>	dehydrogenaza NADH	
		<i>alr</i>	racemaza alaninowa	
		<i>ddl</i>	ligaza D-alanylo-D-alaninowa	
PAS	1–8	<i>cycA</i>	białko symportowe D-seryny	
		<i>dfrA</i>	reduktaza dihydrofolianowa	
NOWE LEKI	TMC-207	0,03	<i>thyA</i>	syntaza tymidylanowa
	PA-824	0,015–0,25	<i>atpE</i>	podjednostka c syntazy ATP
	OPC-67683	0,006–0,012	<i>ddn/fdg1</i>	nitroreduktaza/dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa zależne od koenzymu F420
	SQ-109	0,5	<i>mmpL3</i>	błonowe białko transportujące kwasy mykolowe

MIC, minimalne stężenie hamujące (ang. *minimal inhibitory concentration*); INH, izoniazyd; RMP, rifampicyna; PZA, pirazynamid; EMB, etambutol; SM, streptomycyna; Am, amikacyna; Km, kanamycyna; Cm, kapreomycyna; FQ, fluorochinolon; Eto/Pto, etionamid/protionamid; Cs/Trd, cykloseryna/teryzyd; PAS, kwas *p*-aminosalicylowy; ACP, białko nośnikowe grup acylowych; ATP, adenozylo-5'-trifosforan.

za oporność na Km i Am lokalizują się w genie *rrs*, ale przesunięte są bliżej domeny 3' genu.

Spośród GLIKOPEPTYDÓW używanych w terapii przeciwgruźliczej, najbardziej znana jest KAPREOMYCINA (Cm). Jest to makrocycliczny antybiotyk polipeptydowy, oryginalnie wyizolowany z hodowli *Streptomyces mutabilis* subsp. *capreolus*. Podobnie do aminoglikozydów, Cm hamuje syntezę białek bakteryjnych. Przy czym miejscem działania leku jest interfeza między obiema podjednostkami złożonego kompletnego rybosomu 70S, a ściślej mostek tworzący się na skutek oddziaływań dwóch helis cząsteczek 16S i 23S rRNA. Za oporność na Cm odpowiadają nierzadko te same mutacje w genie *rrs*, które są źródłem oporności na aminoglikozydy. Prowadzi to do oporności krzyżowej między Cm i Am, a jeszcze częściej Cm i Km (AKBERGENOV i współaut. 2011).

Antybiotyki aminoglikozydowe i polipeptydowe mają podobne działania niepożądane.

U większości leczonych powodują zaburzenia narządu słuchu i równowagi. Jako, że niemal w całości wydalane są przez nerki w stanie nie zmienionym, leki te mogą mieć też działanie nefrotoksyczne.

### III grupa

FLUOROCHINOLONY (FQ) to grupa chemioterapeutyków szerokospektralnych, o silnym działaniu bakteriobójczym, w tym prątkobójczym, stosowanych w leczeniu gruźlicy od połowy lat 80. ub. w. Chemicznie wywodzą się od kwasu nalidyksowego, otrzymanego jako produkt uboczny przy oczyszczaniu antymalarycznego leku chlorochiny. Jak wskazuje nazwa, FQ cechuje obecność atomu fluoru zwykle w pozycji 6 pierścienia chinolonowego, który, podobnie jak w wypadku kwasu nalidyksowego, stanowi zrab struktury cząsteczki leku. FQ hamują replikację bakteryjnego DNA wiążąc się z białkiem gyrazy, zaliczanym do topoizomeraz, enzymów najogólniej odpowiedzialnych za

stopień skręcenia podwójnej helisy. Gyraza (topoizomeraza II) generuje powstawanie ujemnych super-skrętów w kolistym DNA, co umożliwia rozkręcanie podwójnej nici podczas replikacji.

Oporność prątków na FQ związana jest z mutacjami w genach *gyrA* i *gyrB*, kodujących dwie podjednostki (A i B) gyrazy. W szczepach *M. tuberculosis* opornych na FQ, mutacje w genie *gyrA*, a ściślej jego niewiele ponad 100-nukleotydowym regionie (ang. quinolone resistance-determining region, QRDR), występują u ok. 64% szczepów opornych na FQ (MARURI i współaut. 2012).

Spośród FQ używanych w leczeniu gruźlicy najmniejszą aktywność ma OFLOKSACYNA (Ofx), nieco większą LEWOFLOKSACYNA (Lfx), zaś największą fluorochinolony III generacji: MOKSYFLOKSACYNA (Mfx) i GATYFLOKSACYNA (Gfx). Oporność krzyżowa między FQ jest zjawiskiem częstym.

FQ podawane są doustnie, dobrze wchłaniają się z przewodu pokarmowego, metabolizowane są w wątrobie, a wydalane przez nerki. FQ należą do najbezpieczniejszych leków przeciwprątkowych II rzutu i rzadko wywołują działania niepożądane.

#### IV grupa

ETIONAMID (Eto) i PROTIONAMID (Pto) są lekami bardzo do siebie podobnymi, zarówno pod względem struktury chemicznej, jak i mechanizmu działania. Nawiązują przy tym wybitnie do INH. Oba leki są, tak jak INH, pochodnymi kwasu izonikotynowego; Eto jest amidem kwasu 2-etylo-izonikotynowego, a Pto amidem kwasu 2-propylo-izonikotynowego. Podobnie do INH, działają bakteriobójczo na prątki aktywne metabolicznie, znajdujące się wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo. Wspólny z INH jest też ich mechanizm działania, polegający na hamowaniu biosyntezy kwasów mykoloowych. W końcu, tak samo jak INH, Eto i Pto są prolekami, które wymagają przeprowadzenia do formy farmakologicznie czynnej. Tutaj kluczową rolę odgrywa monooksygenaza flawoproteinowa (EthA). Utlenione formy Eto i Pto, tak samo jak w wypadku INH, tworzą addukty z NAD<sup>+</sup> lub NADP<sup>+</sup>, które następnie blokują białko InhA, tj. reduktazę enoilo-ACP, uczestniczącą w syntezie kwasów mykoloowych.

Źródłem oporności prątków na Eto i Pto są mutacje w genach *inhA* (głównie w regionie promotorowym), *ndh*, *ethA* i *ethR*, kodującym negatywny regulator transkrypcji genu *ethA*. Mutacje w dwóch pierwszych genach prowadzą zwykle do oporności krzyżowej między Eto/Pto a INH (BROSSIER i współaut. 2011).

Eto/Pto podawane są doustnie, szybko wchłaniają się z przewodu pokarmowego,

podlegają metabolicznym przemianom w wątrobie i wydalane są przez nerki. Oba leki są zwykle źle tolerowane i powodują wielokierunkowe efekty uboczne.

CYKLOSERYNA (Cs) to antybiotyki naturalnie produkowane przez różne gatunki promieniowców (*Streptomyces* spp.), który w leczeniu gruźlicy stosowany jest (w formie syntetycznej) od połowy lat 50. ub. w. Choć Cs jest aktywna wobec większości gatunków prątków, jej działanie, w głównej mierze bakteriostatyczne, w porównaniu z innymi lekami przeciwprątkowymi jest słabe.

Cs jest analogiem strukturalnym D-alaniny i działa jako kompetytywny inhibitor dwóch enzymów: racemazy alaninowej (Alr) i ligazy D-alanylo-D-alaninowej (Ddl), katalizujących, odpowiednio przekształcenie L-alaniny w D-alaninę oraz wytworzenie wiązania peptydowego między dwiema D-alaninami. Oba te procesy są kluczowe w biosyntezie muramioilopentapeptydu będącego prekursorem w biosyntezie peptydoglikanu. Mechanizm oporności na Cs w prątkach gruźlicy jest niejasny. Z badań przeprowadzonych na szczepach *M. smegmatis* wynika, że nadekspresja białek Alr i Ddl prowadzi do wytworzenia oporności na Cs, choć w wypadku białka Alr, miano tej oporności jest wyższe. Sugeruje to rolę racemazy alaninowej jako głównego molekularnego celu działania Cs (FENG i BARLETTA 2003).

Cs lub wytworzony przez połączenie jej dwóch cząsteczek TERYZYDON (Trd) to leki przyjmowane doustnie, dobrze wchłaniające się z przewodu pokarmowego i wydalane przez nerki. Ich stosowanie ograniczają częste objawy niepożądane, głównie o charakterze neurologicznym.

KWAS PARA-AMINOSALICYLOWY (PAS) wywiera działanie bakteriostatyczne na prątki zlokalizowane pozakomórkowo. Mimo że PAS jest, po SM, drugim najstarszym lekiem przeciwprątkowym (w terapii gruźlicy stosowany od 1946 r.), mechanizm jego działania nie został w pełni wyjaśniony. Najprawdopodobniej, PAS zaburza metabolizm kwasu foliowego. Jak niedawno wykazano, PAS jest prolekiem, aktywowanym przez dwa enzymy szlaku folianowego, tj. syntazę dihydropterynianową (DHPS, FolP) i syntazę dihydrofolianową (DHFS, FolC). Produktem aktywacji PAS jest hydroksydihydrofolian, działający jako inhibitor reduktazy dihydrofolianowej (DHFR), enzymu odpowiedzialnego za powstanie biologicznie czynnej formy kwasu foliowego, tetrahydrofolianu (ZHENG i współaut. 2013). Oporność prątków na PAS ma, jak się wydaje, determinację wielogenową. W szczepach PAS-opornych wykrywa się mutacje w genie *dfrA*, kodującym enzym DHFR, a także *thyA*, którego produktem białkowym

jest syntaza tymidylanowa, enzym uczestniczący w biosyntezie tyminy. Mutacje w genie *thyA* zmniejszające aktywność enzymu, a przez to zużycie tetrahydrofolianu, obserwowano u 37% szczepów opornych na PAS (MATHYS i współaut. 2009).

PAS metabolizowany jest w wątrobie i wydalany przez nerki. U wielu przyjmujących ten lek wywołuje zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego. Jest też hepatotoksyczny.

#### V grupa

Grupa ta obejmuje różne chemioterapeutyki, których aktywność przeciwprątkowa jest niejasna lub niepotwierdzona. Leki te nie są zalecane do leczenia gruźlicy. Sięga się po nie tylko wówczas, gdy leki pozostałych grup (I–IV) nie wystarczają dla ułożenia skutecznego, kombinowanego schematu lekowego dla leczenia gruźlicy wielolekoopornej typu MDR i XDR (DOOLEY i współaut. 2013).

**KLARYTROMYCYNA** (Clr) należy do antybiotyków makrolidowych, które hamują syntezę białek wiążąc się z domeną peptydylotransferazową na podjednostce 50S rybosomów. Clr działa na prątki bakteriostatycznie. Wrażliwe są głównie prątki atypowe, w tym prątki kompleksu *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAIC). Prątki gruźlicy wykazują zwykle oporność na Clr indukowaną niskimi stężeniami leku. Główną rolę odgrywa tu metylotransferaza, produkt genu *erm37*, która metylując cząsteczki 23S rRNA, uniemożliwia wiązanie się z nimi leku (DOOLEY i współaut. 2013).

**KLOFAZYMINA** (Cfz), pochodna fenazy, jest chemioterapeutyką o słabym działaniu bakteriobójczym, stosowaną głównie w leczeniu trądu. Mechanizm działania leku jest nieznan. Możliwe, że lek generuje reaktywne formy tlenu i zaburza reakcje energetyczne w przebiegu oddychania. Prawdopodobnym źródłem oporności prątków na Cfz jest aktywne usuwanie leku z komórki.

**LINEZOLID** (Lzd) jest przedstawicielem stosunkowo nowej grupy syntetycznych chemioterapeutyków, zwanej oksazolidynonami. Lzd stosowany jest głównie w leczeniu infekcji wywołanych lekoopornymi bakteriami Gram-dodatnimi. Wykazuje też istotną aktywność przeciwprątkową, hamując wzrost prątków *M. tuberculosis* w stężeniu 1 mg/L (DOOLEY i współaut. 2013). Dokładny mechanizm działania Lzd, podobnie jak innych oksazolidynonów, nie jest znany. Wiadomo, że Lzd hamuje wczesne etapy syntezy białek, wiążąc się z w obrębie domeny peptydylotransferazowej podjednostki 50S rybosomów. W szczepach opornych na Lzd obserwowano mutacje w genie *rrl*, kodują-

cym 26S rRNA oraz genie *rplC*, kodującym rybosomalne białko L3 (ZHANG i współaut. 2014b). Lzd jest skutecznym lekiem w terapii gruźlicy wielolekoopornej, przy czym powoduje stosunkowo często objawy uboczne (m.in. niedokrwistość, neuropatie).

**TIOACETAZON** (Thz) należy do klasy tiosemikarbazonów. Lek wywiera słaby, bakteriostatyczny efekt na prątki, za to często wywołuje u chorych działania niepożądane. Jak dotąd, nie ustalono co stanowi główną tarczę dla działania Thz, ani w jaki sposób rozwija się oporność na ten lek. Najnowsze badania pokazują jedynie, że Thz blokuje aktywność enzymów uczestniczących w cyklopropanacji kwasów mykolowych, co jednak nie upośledza metabolizmu prątków (ALAHARI i współaut. 2007).

### NOWE LEKI PRZECIWPRAŃKOWE

Z wyjątkiem Lzd i fluorochinolonów III generacji (Mfx, Gfx), wszystkie pozostałe leki przeciwprątkowe, krótko scharakteryzowane powyżej, mają historię najmniej pięciu dekad. Dopiero w ostatnich kilku latach pojawiły się nowe leki przeciwprątkowe, których skuteczność i bezpieczeństwo w leczeniu gruźlicy jest przedmiotem wielu trwających obecnie badań klinicznych (II i III fazy). Poniżej omówiono kilka najbardziej obiecujących preparatów.

**BEDAKILINA** (TMC-207) to syntetyczny chemioterapeutyk z grupy diarylocholin, którego aktywność prątkobójczą po raz pierwszy wykazano w 2005 r. W 2012 r. lek został dopuszczony do leczenia gruźlicy typu MDR u dorosłych przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA), a w 2014 r. także przez Europejską Agencję Leków (ang. European Medicines Agency, EAM). Bedakilina jest wysoce aktywna wobec prątków *M. tuberculosis* (MIC=0,03 mg/L), działając zarówno na prątki mnożące się, jak i będące w stanie uśpienia. Uwagę zwraca nowy mechanizm działania leku. Jest on inhibitorem pompy protonowej  $F_0F_1$ -syntazy ATP. Efektem działania leku jest obniżenie puli wewnątrzkomórkowego ATP, co prowadzi do śmierci komórki. Otrzymane w warunkach *in vitro* szczepy *M. tuberculosis* odporne na bedakilinę zawierały mutacje w genie *atpE*, kodującą podjednostkę c w części  $F_0$  kompleksu ATP-azy (ANDRIES i współaut. 2005).

**PRETOMANID** (PA-824) i **DELAMANID** (OPC-67683) reprezentują grupę syntetycznych chemioterapeutyków, pochodnych nitroimidazolu. Oba leki wykazują działanie bakteriobójcze wobec prątków o aktywnym i uśpionym metabolizmie. Oba związki są też prolekami i ulegają aktywacji przez usu-

nięcie grupy nitrowej w pierścieniu imidazolowym. W reakcji tej, katalizowanej przez nitroreduktazę zależną od koenzymu F420 (Ddn), jako produkty uboczne powstają reaktywne formy azotu, które poprzez m.in. zaburzenie aktywności katalitycznej enzymów łańcucha oddechowego prowadzą do śmierci komórki. Jest to główny mechanizm działania obu leków w warunkach hipoksji, którą znoszą prątki w stanie anabiozy. W warunkach tlenowych, pretomanid i delamanid upośledzają biosyntezę kwasów mykoloowych (MUKHERJEE i BOSHOFF 2011). Mutacje w genach *ddn*, *fgd1* i kilku innych, których białkowe produkty zaangażowane są w biosyntezę koenzymu F420, opisano w otrzymanych *in vitro* szczepach *M. tuberculosis* opornych na pretomanid (HAVER i współaut. 2015). W 2013 r. delamanid został warunkowo dopuszczony do leczenia gruźlicy typu MDR przez EAM.

SQ-109 jest analogiem strukturalnym EMB, o odmiennym mechanizmie działania i aktywności wobec prątków opornych na EMB. Molekularnym celem dla SQ-109 jest błonowe białko MmpL3 eksportujące kwasy mykoloowe, w postaci estrów trehalozy, z cytoplazmy do ściany komórkowej. W efekcie dochodzi do zaburzenia jej struktury i toksyczności dla komórki cytoplazmatycznej akumulacji kwasów mykoloowych. Powyższy model działania SQ-109 oparto na analizie wyprowadzonych *in vitro* mutantów *M. tuberculosis* opornych na ten lek; wszystkie takie szczepy niosły mutacje w genie *mmpL3* (TAHLAN i współaut. 2012).

W II fazie badań klinicznych są w końcu dwa preparaty oznaczone jako PNU-100480 (sutezolid) i AZD-5847. Oba związki należą do oksazolidynonów i są pochodnymi Lzd. Opracowano je chcąc zwiększyć jeszcze działanie bakterioobójcze jakie wykazuje Lzd, przy jednoczesnym zminimalizowaniu groźnych działań niepożądanych, jakie ten lek wywołuje.

## LECZENIE GRUŻLICY LEKOOPORNEJ

Gruźlica lekowrażliwa jest chorobą w pełni wyleczalną przy zastosowaniu standardowego 6-miesięcznego kursu leczenia (Tabela 2). Obejmuje on fazę intensywną, w której przez 2 miesiące chory otrzymuje 4 podstawowe leki przeciwprątkowe (INH, RMP, PZA i EMB) oraz 4-miesięczną fazę podtrzymującą, w której podaje się już tylko 2 leki, tj. INH i RMP. Ta dwufazowość charakteryzuje większość schematów leczenia gruźlicy i polega na celowanej eliminacji prątków o odmiennej aktywności metabolicznej. W intensywnej fazie leczenia dochodzi do zabicia większości prątków mnożących się w zmia-

nach chorobowych. Leczenie podtrzymujące prowadzi do eliminacji prątków o zahamowanym, okresowo tylko nasilającym się metabolizmie. Daje to efekt wyjąłwiający, zapobiegając nawrotom choroby. O powodzeniu leczenia decyduje właściwy dobór leków (bezwzględnie konieczne jest użycie najmniej dwóch leków, na które prątki są wrażliwe), regularność (wg zaleconego dawkowania i w określonym rytmie) i odpowiednio długi czas ich przyjmowania, a także monitorowanie, w oparciu o badania kliniczne i bakteriologiczne, skuteczności prowadzonej terapii. Zasady te obowiązują zarówno w leczeniu gruźlicy lekowrażliwej, jak i lekoopornej. Jednak w wypadku tej ostatniej, a szczególnie gruźlicy typu MDR, czas leczenia znacząco się wydłuża, a odsetek wyleczeń istotnie się zmniejsza. Jest tak dlatego, że gruźlica, w której prątki wykazują oporność na dwa lub więcej głównych leków przeciwprątkowych, wymaga stosowania leków II rzutu. Leki te mają zwykle znacznie słabsze działanie od leków podstawowych, są bardziej toksyczne i gorzej tolerowane. Tak więc, okres leczenia gruźlicy lekoopornej jest 4-krotnie dłuższy aniżeli gruźlicy lekowrażliwej i często przekracza 2 lata. Z kolei, odsetek wyleczeń wśród chorych na gruźlicę lekowrażliwą sięga 80%, podczas gdy w wypadku chorych na gruźlicę typu MDR i XDR, odpowiednio, niewiele ponad 30% i 19% (VAN DER WERF i współaut. 2014).

Nie bez znaczenia jest też wymiar ekonomiczny leczenia gruźlicy wielolekoopornej. Leki II rzutu są często wielokrotnie droższe od leków podstawowych, co ujemnie wpływa na ich dostępność dla chorych, szczególnie w krajach o średnim i niskim dochodzie. Jednocześnie, to właśnie te kraje są najbardziej dotknięte gruźlicą lekooporną. Według danych WHO, w 2014 r. średni koszt leczenia jednostkowego przypadku gruźlicy lekowrażliwej nie przekraczał 1 tys. USD. W wypadku gruźlicy typu MDR, koszt leczenia jednego chorego wynosił średnio 7 tys. i 21 tys. USD, odpowiednio w krajach o niskim i średnim dochodzie (WHO 2015). W krajach wysoko rozwiniętych, takich jak Stany Zjednoczone, koszt leczenia chorego na gruźlicę typu MDR może przekroczyć 130 tys. USD, a w wypadku gruźlicy XDR 430 tys. USD (MARKS i współaut. 2014).

Konieczność przyjmowania kilku leków i to przez długi czas sprawia, że leczenie gruźlicy jest trudne. Jego sukces zależy od dobrej współpracy chorego z lekarzem prowadzącym; wymaga dużej dyscypliny i cierpliwości chorego. Korzystając z doświadczeń strategii DOTS i jej poszerzonej wersji DOTS-Plus, dedykowanej gruźlicy lekoopornej, a także w oparciu o wyniki kontrolowa-

nych badań klinicznych, wypracowano szereg zaleceń, których przestrzeganie prowadzi do wyleczenia nawet gruźlicy wielolekoopornej. W odniesieniu do leczenia gruźlicy lekoopornej, wytyczne sformułowane najpierw przez WHO (WHO 2011), zostały, na gruncie krajowym, recypowane w specjalnym dokumencie Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc (AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ i współaut. 2013). Do najważniejszych zaleceń należą:

- wybór schematu leczenia powinien uwzględniać dotychczasową historię leczenia i wyniki lekowrażliwości prątków;

- leki należy stosować codziennie, pod bezpośrednim nadzorem przez cały czas leczenia;

- bez informacji o lekowrażliwości prątków nigdy nie wolno dodawać pojedynczego leku u chorych, których odpowiedź na stosowane leczenie nie jest wystarczająca;

- w przypadkach o wysokim ryzyku wielolekooporności, do czasu uzyskania wyników lekowrażliwości należy podać zestaw leków zalecany w leczeniu gruźlicy typu MDR;

- w trakcie leczenia zalecana jest regularna kontrola kliniczna, radiologiczna i bakteriologiczna wyników leczenia oraz występowania działań niepożądanych.

Ponadto, w leczeniu gruźlicy typu MDR należy:

- w fazie intensywnej stosować co najmniej 5 leków, w tym najmniej 4 leki II rzutu o możliwej skuteczności; schemat powinien uwzględniać PZA, fluorochinolon nowszej generacji (zamiast Ofx – Lfx, Gfx lub Mfx), Eto lub Pto, a także Cs, Trd lub PAS, i w końcu, w fazie intensywnej, lek podawany parenteralnie (Km, Am lub Cm);

- EMB i leki grupy V, wg podziału WHO, traktować jako leki dodatkowe do wyżej wymienionych;

- wykonywać badanie bakteriologiczne co miesiąc do czasu odprątkowania, a następnie co 3 miesiące do zakończenia leczenia;

- intensywną fazę leczenia prowadzić przez co najmniej 8 miesięcy, a całe leczenie co najmniej 20 miesięcy.

Zasady wymienione wyżej obowiązują także w leczeniu gruźlicy typu XDR. Leki dobiera się ściśle na podstawie historii leczenia i wyników lekowrażliwości prątków. Niekiedy, nawet wobec stwierdzonej *in vitro* oporności prątków na dany lek, utrzymuje się go w schemacie z uwagi na możliwość zachowanej aktywności przeciwaprątkowej w tkankach.

W przebiegu leczenia gruźlicy lekoopornej, szczególna odpowiedzialność jest po stronie mikrobiologów i diagnostów. Wyniki regularnie prowadzonych badań bakteriologicznych, w tym testów lekowrażliwości, pozwalają nie tylko ocenić skuteczność ak-

tualnego schematu leczenia, ale także go korygować i zmieniać. Przy czym, wszelkie modyfikacje postępowania terapeutycznego powinny być wprowadzane ostrożnie, z uwzględnieniem całościowej oceny stanu klinicznego chorego.

## DIAGNOSTYKA GRUŻLICY LEKOOPORNEJ

Przez długi czas dostępne były jedynie fenotypowe metody oznaczania lekowrażliwości prątków, polegające na ocenie wzrostu bakterii na pożywkach mikrobiologicznych zawierających dany lek w odniesieniu do układu kontrolnego, tj. populacji prątków rosnących bez obecności leku. W metodach tych stosowane są zarówno pożywki płynne, jak i stałe. Jedną z pierwszych, a obecnie najpopularniejszą metodą oznaczania lekowrażliwości prątków jest zaproponowana w latach 60. XX w. przez Canettiego tzw. metoda proporcji. Ogólnie zakłada ona, że jeśli szczep wyrasta na pożywce z lekiem populacją stanowiącą najmniej 1% populacji kontrolnej (na pożywce bez leku), uznaje się go za oporny w sensie klinicznym. Metodę proporcji wykonuje się najczęściej na stałej pożywce agarowej (7H10), wg przepisu Middlebrooka lub pożywce jajowej, wg Löwensteina-Jensena. Pożywki płynne wykorzystywane są do oznaczania lekowrażliwości prątków w systemach automatycznych. Obecnie dwa takie systemy są atestowane przez FDA. Są to Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson) oraz VersaTREK Mycobacteria Detection and Susceptibility Testing (Thermo Scientific). Oba systemy używają jako pożywki zmodyfikowanego bulionu Middlebrooka (7H9), ale różnią się systemem detekcji wzrostu. W aparacie Bactec MGIT 960, wzrost prątków mierzony jest fluorymetrycznie. Pożywka zawiera fluorescencyjny komponent, pięciowodzian rutenu, wrażliwy na działanie rozpuszczonego w niej tlenu. Duża jego ilość na początku hodowli absorbuje emisję fluorescencji pochodzącą z komponentu. Wraz ze wzrostem oddychających tlenowo prątków, stężenie tlenu zmniejsza się, skutkując zwiększeniem fluorescencji. Z kolei, aparat VersaTREK rejestruje wzrost prątków poprzez pomiar zmian ciśnienia w warstwie ponad pożywką w butelce hodowlanej, na skutek zużywanego przez prątki tlenu i produkowanego przez nie dwutlenku węgla.

Wraz z rozwojem technik molekularnych, a zwłaszcza po ukończeniu projektu sekwencjonowania *M. tuberculosis* (COLE i współaut. 1998), w diagnostyce gruźlicy zaczęto coraz częściej stosować markery genetyczne, czyli specjalnie dobrane sekwencje DNA, specyficzne dla danego osobnika lub grupy osob-

ników, umożliwiające nie tylko identyfikację taksonomiczną (na poziomie gatunku) i klonalną (na poziomie szczepu), ale także definiujące specyficzne cechy fenotypowe, takie jak wirulencja, czy właśnie lekooporność.

Do wykrywania lekooporności w gruźlicy, w funkcji markerów genetycznych używane są zwykle mutacje w określonych loci, warunkujące stan oporności prątków na dany lek przeciwprątkowy. Spośród wielu metod molekularnych stosowanych w diagnostyce gruźlicy lekoopornej, których omówienie wykracza poza ramy obecnego opracowania, większość opiera się o technikę PCR. Zapewnia ona amplifikację locus, o którym wiadomo, że zawiera mutacje opornościowe. PCR wymaga odpowiednio przygotowanej matrycy, którą jest wyizolowany ze szczepów lub bezpośrednio z materiału klinicznego prątkowy DNA, a także właściwie zaprojektowanych starterów, flankujących badany region. Amplifikacja DNA przez PCR stanowi pierwszy etap w każdej metodzie wykrywającej prątkowe mutacje opornościowe. Różnice między poszczególnymi metodami polegają na sposobie detekcji mutacji w otrzymanym produkcie PCR. W tym celu stosuje się najczęściej analizę sekwencyjną (sekwencjonowanie DNA) lub hybrydyzacyjną (hybrydyzacja z użyciem odpowiednio zaprojektowanych sond genetycznych) i coraz rzadziej już, restrykcyjną (ang. restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP).

Niektóre spośród metod molekularnych wykrywania lekooporności zostały opracowane w formie komercyjnie dostępnych testów diagnostycznych i są z powodzeniem używane w wielu laboratoriach prątka na świecie. Przykładem jest system GeneXpert MTB/RIF (Cepheid), rekomendowany przez WHO i zatwierdzony do użytku przez FDA oraz Europejskie Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC), umożliwiający, poza detekcją prątków *M. tuberculosis*, także oznaczenie ich wrażliwości na RMP. System wykorzystuje technikę real-time-PCR (RT-PCR), pozwalającą na równoczesne zastosowanie 5 sond, znakowanych różnymi fluoroforami i wiążących się w obrębie regionu RRDR genu *rpoB*. O obecności mutacji świadczy wygaszenie fluorescencji pochodzącej od co najmniej jednej użytej sondy. System GeneXpert MTB/RIF jest w pełni zautomatyzowany, dostosowany do analizy materiału klinicznego (prób płwociny) a wszystkie procesy, czyli izolacja DNA, PCR i detekcja amplikonu odbywają się w jednym pojemniku (kartrydzu) podzielonym na kilka komór reakcyjnych. Łączny czas wykonania badania wynosi ok. 2 godzin.

Drugi popularny system identyfikacji lekooporności w szczepach *M. tuberculosis* to GenoType MTBDR (HainLifescience), dostępny w formie dwóch testów: MTBDR*plus* i MTBDR*sL*, wykrywających oporność prątków na INH i RMP (MTBDR*plus*), a także fluoro-chinolony, aminoglikozydy, Cm i EMB (MTBDR*sL*). Zasada obu testów jest ta sama i polega na amplifikacji techniką PCR multiplex wybranych regionów DNA, skupiających mutacje warunkujące oporność na dany lek przeciwprątkowy, a następnie hybrydyzacji powstałych amplikonów z odpowiednio zaprojektowanymi oligonukleotydowymi sondami, odpowiadającymi niezmiennym lub zmutowanym wariantom badanych sekwencji, związanymi na pasku nitrocelulozowym. Układ prążków na pasku, uwidoczniony w reakcji chemiluminescencji, wskazuje na obecność lub brak określonych mutacji (GAZI i współaut. 2015).

Pomijając aspekty techniczne i finansowe, metody molekularne oznaczania lekowrażliwości mają tę niewątpliwą przewagę nad metodami konwencjonalnymi (fenotypowymi), że w sposób istotny skracają czas badania. O ile test lekowrażliwości na pożywkach mikrobiologicznych trwa co najmniej 7-10 dni, wydłużając się niekiedy do 8-12 tygodni, otrzymanie wyniku testu genetycznego zajmuje zwykle kilka godzin (LAURENZO i MOUSA 2011). Ograniczeniem testów genetycznych jest pula mutacji używanych jako markery lekooporności. Złożoność mechanizmów oporności prątków na leki sprawia, że czułość tych testów może być niedostateczna. Innymi słowy, szczepy odporne na dany lek przeciwprątkowy mogą zostać oznaczone jako lekowrażliwe, gdyż niosą inne mutacje niż te uwzględnione w panelu testowym. Dlatego wciąż trwają intensywne prace nad optymalizacją układów markerowych, minimalizujących ryzyko otrzymania wyników fałszywie ujemnych. Badania w tym zakresie prowadzi także zespół badawczy w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

## PODSUMOWANIE

Problem gruźlicy lekoopornej ogniskuje zainteresowanie i wysiłki wielu grup badawczych na całym świecie. Działania obecnie podejmowane w celu ograniczenia, a przynajmniej złagodzenia skutków zjawiska lekooporności *M. tuberculosis* są wielokierunkowe. Po pierwsze, trwają intensywne poszukiwania nowych, skutecznych leków przeciwprątkowych. Jednocześnie oceniana jest użyteczność kliniczna kilku niedawno wprowadzonych chemioterapeutyków. Kolejnych kilka preparatów jest w fazie badań

przedklinicznych. Po drugie, szeroko prowadzone są badania dotyczące molekularnych mechanizmów lekooporności. Mają one na celu zdefiniowanie genetycznych determinantów oporności prątków na poszczególne leki przeciwprątkowe. Wyniki tych badań mają istotne znaczenie aplikacyjne. Wykorzystuje się je do opracowania układów markerowych w testach genetycznych wykrywających lekooporne fenotypy prątków. Po trzecie, coraz więcej ośrodków na całym świecie realizuje szczegółową sprawozdawczość epidemiologiczną gruźlicy lekoopornej, uwzględniającą wyniki nowoczesnych badań z zakresu epidemiologii molekularnej prątka gruźlicy. Chodzi tu o wykorzystanie metod typowania genetycznego, przede wszystkim dla ustalenia źródeł i dróg transmisji zakażeń prątkowych (JAGIELSKI i współaut. 2010c, d). W końcu, podejmowane są stale, przez różne instytucje i organizacje, nowe inicjatywy i akcje o charakterze szkoleniowym i edukacyjnym, których zadaniem jest podniesienie świadomości zdrowotnej społeczeństw w odniesieniu do problemu gruźlicy, a szczególnie gruźlicy lekoopornej, przez propagowanie wiedzy na temat skutecznych metod leczenia i profilaktyki zakażeń prątkowych.

#### Streszczenie

Gruźlica pozostaje nadal jednym z największych zagrożeń zdrowotnych dla populacji ludzkiej. Każdego roku notuje się około 9 mln nowych zachorowań na gruźlicę i blisko 2 mln zgonów z powodu tej choroby. Wśród najważniejszych czynników, które negatywnie wpływają na sytuację epidemiologiczną gruźlicy w świecie jest lekooporność wywołujących ją prątków *Mycobacterium tuberculosis*. Szczególne znaczenie ma oporność typu MDR (ang. multidrug resistance), definiowana jako oporność prątków na co najmniej izoniazyd (INH) i rifampicynę (RMP), dwa kluczowe leki stosowane w terapii gruźlicy.

Główną rolę w kształtowaniu oporności na leki przeciwprątkowe odgrywają spontaniczne mutacje w genach kodujących białka lub RNA będące często, choć nie zawsze, celami molekularnymi tych leków. W szczepach *M. tuberculosis* mutacje występują z różną częstością i w różny sposób kształtują ich fenotyp lekooporności, co wyraża się odmiennym mianem oporności szczepu na dany lek przeciwprątkowy.

Niniejsza praca omawia najważniejsze zagadnienia związane z lekoopornością w gruźlicy, w tym epidemiologię, diagnostykę i leczenie gruźlicy lekoopornej. Najwięcej miejsca w pracy zajmuje charakterystyka leków stosowanych obecnie w leczeniu gruźlicy, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów ich działania i oporności na nie prątków.

#### LITERATURA

- AKBERGENOV R., SHCHERBAKOV D., MATT T., DUSCHA S., MEYER M., WILSON D. N., BÖTTGER E. C., 2011. *Molecular basis for the selectivity of antituberculosis compounds capreomycin and viomycin*. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 4712-4717.
- ALAHARI A., TRIVELLI X., GUERARDEL Y., DOVER L. G., BESRA G. S., SACCHETTINI J. C., REYNOLDS R. C., COXON G. D., KREMER L., 2007. *Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria*. PLoS One 2, e1343.
- ANDRIES K., VERHASSELT P., GUILLEMONT J., GÖHLMANN H. W., NEEFS J. M., WINKLER H., VAN GESTEL J., TIMMERMAN P., ZHU M., LEE E., WILLIAMS P., DE CHAFFOY D., HUITRIC E., HOFFNER S., CAMBAU E., TRUFFOT-PERNOT C., LOUNIS N., JARLIER V., 2005. *A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis*. Science 307, 223-227.
- AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., DEMKOW U., GRZELEWSKA-RZYMOWSKA I., KORZENIEWSKA-KOSEŁA M., LANGFORT R., MICHAŁOWSKA-MITCZUK D., ROWIŃSKA-ZAKRZEWSKA E., ZIELONKA T. M., ZIÓŁKOWSKI J., ZWOLSKA Z., 2013. *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące rozpoznawania, leczenia i zapobiegania gruźlicy u dorosłych i dzieci*. Pneumonol. Alergol. Pol. 81, 4325-4379.
- BROSSIER F., VEZIRIS N., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., SOUGAKOFF W., 2011. *Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 355-360.
- COLE S. T., BROSCHE R., PARKHILL J., GARNIER T., CHURCHER C., HARRIS D., GORDON S. V., EIGLMEIER K., GAS S., BARRY C. E., TEKAIA F., BADCOCK K., BASHAM D., BROWN D., CHILLINGWORTH T. i współaut., 1998. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature 393, 537-544.
- DOOLEY K. E., OBUKU E. A., DURAKOVIC N., BELITSKY V., MITNICK C., NUERMBERGER E. L.; EFFICACY SUBGROUP, RESIST-TB, 2013. *World Health Organization group 5 drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: unclear efficacy or untapped potential?* J. Infect. Dis. 207, 1352-1358.
- FENG Z., BARLETTA R. G., 2003. *Roles of Mycobacterium smegmatis D-alanine:D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 283-291.
- GAZI M. A., ISLAM M. R., KIBRIA M. G., MAHMUD Z., 2015. *General and advanced diagnostic tools to detect Mycobacterium tuberculosis and their drug susceptibility: a review*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34, 851-861.
- HARRIS R. E., 2013. *Epidemiology of tuberculosis*. [W:] *Epidemiology of chronic disease. Global perspectives*. HARRIS R. E. (red.). Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, 673-686.
- HAYER H. L., CHUA A., GHODE P., LAKSHMINARAYANA S. B., SINGHAL A., MATHEMA B., WINTJENS R., BIFANI P., 2015. *Mutations in genes for the F420 biosynthetic pathway and a nitroreductase enzyme are the primary resistance determinants in spontaneous in vitro-selected PA-824-resistant mutants of Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 5316-5323.
- JAGIELSKI T., 2010. *Molekularna analiza epidemiologiczna szczepów Mycobacterium tuberculosis o wielolekooporności typu MDR, wyizolowanych od chorych na gruźlicę w Polsce, w 2004 roku*. Praca doktorska. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa.



- JAGIELSKI T., AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., ZWOLSKA Z., 2010a. *Epidemiologia gruźlicy w perspektywie świata, Europy i Polski*. Wiad. Lek. 63, 230-246.
- JAGIELSKI T., AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., ZWOLSKA Z., 2010b. *Epidemiologia gruźlicy lekoopornej: świat – Europa – Polska*. Wiad. Lek. 64, 345-357.
- JAGIELSKI T., AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., ZWOLSKA Z., 2010c. *Typowanie genetyczne prątków Mycobacterium tuberculosis. Przegląd ważniejszych technik badawczych. Część I*. Pol. Merkur. Lek. 29, 206-211.
- JAGIELSKI T., AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., ZWOLSKA Z., 2010d. *Typowanie genetyczne prątków Mycobacterium tuberculosis. Przegląd ważniejszych technik badawczych. Część II*. Pol. Merkur. Lek. 29, 212-216.
- JAGIELSKI T., IGNATOWSKA H., BAKUŁA Z., DZIEWIT Ł., NAPIÓRKOWSKA A., AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., ZWOLSKA Z., BIELECKI J., 2014. *Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Poland*. PLoS One 9, e100078.
- KLOPPER M., WARREN R. M., HAYES C., GEY VAN PITTIUS N. C., STREICHER E. M., MÜLLER B., SIRGEL F. A., CHABULA-NXIWENI M., HOOSAIN E., COETZEE G., DAVID VAN HELDEN P., VICTOR T. C., TROLLIP A. P., 2013. *Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa*. Emerg. Infect. Dis. 19, 449-455.
- KOZIŃSKA M., BRZOSTEK A., KRAWIECKA D., RYB-CZYŃSKA M., ZWOLSKA Z., AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E., 2011. *MDR, pre-XDR and XDR drug-resistant tuberculosis in Poland in 2000-2009*. Pneumonol. Alergol. Pol. 79, 278-287.
- LAURENZO D., MOUSA S. A., 2011. *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis and current status of rapid molecular diagnostic testing*. Acta Trop. 119, 5-10.
- MACHADO D., COUTO I., PERDIGÃO J., RODRIGUES L., PORTUGAL I., BAPTISTA P., VEIGAS B., AMARAL L., VIVEIROS M., 2012. *Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One 7, e34538.
- MARKS S. M., FLOOD J., SEAWORTH B., HIRSCH-MOVERMAN Y., ARMSTRONG L., MASE S., SALCEDO K., OH P., GRAVISS E. A., COLSON P. W., ARMITIGE L., REVUELTA M., SHEERAN K., TB EPIDEMIOLOGIC STUDIES CONSORTIUM, 2014. *Treatment practices, outcomes, and costs of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, United States, 2005-2007*. Emerg. Infect. Dis. 20, 812-821.
- MARURI F., STERLING T. R., KAIGA A. W., BLACKMAN A., VAN DER HELDEN Y. F., MAYER C., CAMBAU E., AUBRY A., 2012. *A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system*. J. Antimicrob. Chemother. 67, 819-831.
- MASLOW M. J., PORTAL-CELHAY C., 2015. *Rifamycins*. [W:] Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 8th edition. MANDELL G. L., BENNETT J. E., DOLIN R. (red.). Elsevier/Saunders, Philadelphia, PA, 339-349.
- MATHYS V., WINTJENS R., LEFEVRE P., BERTOUT J., SINGHAL A., KIASS M., KUREPINA N., WANG X. M., MATHEMA B., BAULARD A., KREISWIRTH B. N., BIFANI P., 2009. *Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 2100-2109.
- MIGLIORI G. B., DE IACO G., BESOZZI G., CENTIS R., CIRILLO D. M., 2007. *First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs*. Euro Surveill. 12, E070517.1.
- MITCHISON D., DAVIES G., 2012. *The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 16, 724-732.
- MUKHERJEE T., BOSHOFF H., 2011. *Nitroimidazoles for the treatment of TB: past, present and future*. Future Med. Chem. 3, 1427-1454.
- MUSSER J., 1995. *Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights*. Clin. Microbiol. Rev. 8, 496-514.
- PLINKE C., RÜSCH-GERDES S., NIEMANN S., 2006. *Significance of mutations in embB codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates*. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1900-1902.
- RISKA P. F., JACOBS W. R., ALLAND D., 2000. *Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 4, S4-S10.
- SHARMA S. K., MOHAN A., 2006. *Multidrug-resistant tuberculosis. A menace that threatens to destabilize tuberculosis control*. Chest 130, 261-272.
- TAHLAN K., WILSON R., KASTRINSKY D. B., ARORA K., NAIR V., FISCHER E., BARNES S. W., WALKER J. R., ALLAND D., BARRY C. E., BOSHOFF H. I., 2012. *SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalosemonomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 1797-1809.
- TIMMINS G. S., DERETIC V., 2006. *Mechanisms of action of isoniazid*. Mol. Microbiol. 62, 1220-1227.
- UDWADIA Z. F., AMALE R. A., AJBANI K. K., RODRIGUES C., 2012. *Totally drug-resistant tuberculosis in India*. Clin. Infect. Dis. 54, 579-581.
- VAN DER WERF M. J., KÖDMÖN C., HOLLO V., SANDGREN A., ZUCS P., 2014. *Drug resistance among tuberculosis cases in the European Union and European Economic Area, 2007 to 2012*. Euro Surveill. 19, e20733.
- VELAYATI A. A., MASJEDI M. R., FARNIA P., TABARSI P., GHANA VI J., ZIAZARIFI A. H., HOFFNER S. E., 2009. *Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran*. Chest 136, 420-425.
- WHO, 1994. *Tuberculosis. A global emergency*. WHO, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2008. *The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2002-2007: anti-tuberculosis drug resistance in the world: 4<sup>th</sup> global report*. Geneva, Switzerland.
- WHO, 2011. *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. 2011 update*. WHO, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2015. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*. WHO, Geneva, Switzerland.
- YEW W. W., CHAU C. H., 1995. *Drug-resistant tuberculosis in the 1990s*. Eur. Respir. J. 8, 1184-1192.
- ZHANG Y., MITCHISON D., 2003. *The curious characteristics of pyrazinamide: a review*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 7, 6-21.
- ZHANG Y., SHI W., ZHANG W., MITCHISON D., 2014a. *Mechanisms of pyrazinamide action*

- and resistance. *Microbiol. Spectr.* MGM2-0023-2013.
- ZHANG Z, PANG Y, WANG Y, LIU C, ZHAO Y., 2014b. *Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis is significantly associated with linezolid resistance in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in China.* *Int. J. Antimicrob. Agents.* 43, 231-235.
- ZHENG J., RUBIN E. J., BIFANI P., MATHYS V., LIM V., AU M., JANG J., NAM J., DICK T., WALKER J. R., PETHE K., CAMACHO L. R., 2013. *para-aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in Mycobacterium tuberculosis.* *J. Biol. Chem.* 288, 23447-23456.

**KOSMOS Vol. 66, 1, 41-58, 2017**

TOMASZ JAGIELSKI

*Department of Applied Microbiology, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Miecznikowa 1, 02-096 Warsaw, E-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl*

#### DRUG RESISTANCE IN TUBERCULOSIS – MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS

##### Summary

Tuberculosis (TB) still persists as a significant health problem for the entire human population. Every year, about 9 million people develop TB, and nearly 2 million die from the disease. Among major factors that influence current TB epidemiology is drug resistance of its causative agent – *Mycobacterium tuberculosis*. Of particular importance is multidrug resistance, defined as resistance of tubercle bacilli to at least isoniazid (INH) and rifampicin (RMP), the two most potent anti-TB drugs.

The pivotal role in the development of drug resistance in tubercle bacilli is attributed to spontaneous mutations in genes coding for proteins or RNAs that often, yet not always, serve as molecular targets for anti-TB therapeutics. These mutations occur at different frequencies in *M. tuberculosis* strains and differently impact the level of resistance to a specific drug.

This review addresses the most important issues related to drug-resistance in TB, including epidemiology, diagnostics, and treatment strategies for drug-resistant TB. A substantial part of the article is devoted to anti-TB drug's profiles, with particular emphasis on their modes of action and mechanisms of resistance.