



UPPSALA
UNIVERSITET

Är antibiotikaresistens hos *Mycobacterium tuberculosis* ett hot mot människan?

Linnea Blomberg

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Tuberkulos är en bakteriell infektionssjukdom som dödar flest människor näst efter HIV (eng. *human immunodeficiency virus*). Sjukdomen orsakas av *Mycobacterium tuberculosis* och följderna av insjuknandet varierar beroende på vilket organ som infekteras. Smittan sprids via luften och är således svår att skydda sig mot. Bakterien har störst tillväxt i syrerika miljöer och därmed infekteras huvudsakligen lungor. Infektionen i lungcellerna leder till slemproduktion eller en inflammatorisk utsöndring av vätska i lungvävnaden. Följderna av detta är delvis att cellerna i lungan förstörs, vilket i det långa loppet ger en nedsatt andningsfunktion. För att bota tuberkulos utvecklades många olika behandlingsstrategier initialt för att senare avvecklas och ge plats åt den mest framgångsrika terapin: antibiotika. Från att ha varit mycket effektiva droger börjar de bli allt mer ineffektiva, och i vissa fall nästintill verkningslösa. Detta är ett resultat av att bakterien har utvecklat ett effektivt försvar gentemot dessa droger. Till stor del beror antibiotikaresistensens utveckling på en ökad antibiotikaanvändning samt en misskött användning av drogen i fråga. Således måste trycket av antibiotika reduceras samt att nya och effektiva antibiotika måste lanseras för att man skall få bukt med dagens antibiotikaresistens. Att framställa nya läkemedel har länge bortprioriterats då det medför en stor kostnad samt att de befintliga antibiotika har varit fullt dugliga. Det är först nu när resistensen har utvecklats i sådan stor utsträckning som behovet av nya droger är som störst. Forskning av nya läkemedel och andra behandlingsformer är under utveckling och verkar lovande inför framtiden.

Inledning

Det globala samhället har utvecklats enormt mycket de senaste århundradena. Ur ett medicinskt perspektiv har det givit upphov till både för- och nackdelar. En ökad kunskap om mediciner i naturen samt syntetiskt framställda läkemedel innebär stora fördelar, medan möjligheten att resa obegränsat medför en stor spridningsfaktor för en mängd olika sjukdomar. Båda dessa företeelser har resulterat i en ökad användning av mediciner.

Antibiotika är en läkemedelsgrupp som idag används frekvent runt om i världen, och med vilka man har haft stora framgångar när det gäller att bota olika bakteriella sjukdomar. Denna läkemedelsgrupp hämmar tillväxten eller dödar bakterien genom olika mekanismer (Gasbarre *et al.* 2012). För att antibiotikakuren skall lyckas eliminera bakterierna från kroppen finns det specifika instruktioner som måste följas. Är dosen för låg eller behandlingstiden för kort dödas inte alla bakterier. Risken är då stor att vissa bakterier, speciellt de som har större motståndskraft än övriga bakterier, selekteras fram och tillväxer mera än övriga (Norrby & Malmquist 2012). Motståndskraften innebär att bakterien är resistent och har således utvecklat ett stabilt försvar mot det specifikt använda antibiotikumet. Antibiotikaresistens har utvecklats till ett globalt hälsoproblem eftersom infektionerna blir allt svårare att bekämpa samtidigt som de resistenta bakterierna sprids.

För att få förståelse för hur resistens mot antibiotika kan utvecklas och i vissa fall har utvecklats, har jag valt att inrikta mig på den bakteriella sjukdomen tuberkulos (tbc). Mykobakterier kallas de organismer som ger upphov till sjukdomen, varav den humana arten huvudsakligen är *Mycobacterium tuberculosis* (SMI 2012). Beroende på vilket organ som infekteras blir konsekvenserna olika (Dahlström 1967) men sjukdomen är i många fall dödlig (WHO 2012 b). Fokus i denna uppsats kommer att beröra lungtuberkulos då det är den vanligaste formen av sjukdomen (Ripe & Malmquist 2012).

På 1800-talet nådde tuberkulos sitt klimax i västvärlden, men började minska följande århundrade. Behandlingsstrategier så som vaccination av barn, antibiotikakurer och kirurgiska ingrepp utvecklades allt mer och verkade effektivt mot sjukdomen (Dahlström 1967). Dock upphörde minskningen drastiskt år 1984, som ett resultat av ett ökat antal människor med HIV, vilka har ett sämre immunförsvar och lättare infekteras av *M. tuberculosis* (Maitra & Kumar 2007). Därefter började istället en ökning av sjukdomen (Ripe & Malmquist 2012).

Omkring två miljarder människor bär idag på *M. tuberculosis* som nu har utvecklat en resistens mot antibiotika. Med en ökad resistens måste det marknadsföras nya, effektiva läkemedel som kan bota sjukdomen och reducera dess utbredning.

Syftet med denna uppsats är att få en djupare förståelse för hur allvarlig antibiotikaresistens hos tuberkulosinfekterade människor faktiskt är. Mina frågeställningar är därför; utgör antibiotikaresistens hos *M. tuberculosis* ett hot mot människan? Kan vi minska resistensen och i så fall hur? För att få klarhet i detta kommer jag att också gå in på hur antibiotika verkar mot bakterien samt hur resistens utvecklas och sprids.

Tuberkulos

Näst efter den välbekanta sjukdomen HIV, är tuberkulos den infektionssjukdom som dödar flest människor i världen (WHO 2012 b). Det är en luftburen sjukdom som orsakas av bakterien *Mycobacterium tuberculosis* (Ringold 2008). Man har uppskattat att så mycket som en tredjedel av jordens befolkning bär på denna tuberkelbakterie varav två miljoner människor dör årligen (SMI 2012). Infekterade människor kan, i många fall, till en början leva symptomfria under tuberkulosens utveckling (Dahlström 1967). Således kan det finnas ett mörkertal då statistiken kring antalet tuberkulosinfekterade människor inte kan fastställas till hundra procent.

Tuberkulos delas in i två stadier; primär- och postprimär tuberkulos. Primär tuberkulos innefattar ett så kallat primärkomplex, vilket betyder att bakterien angriper och infekterar celler i lungvävnaden och orsakar regional inflammation i huvudsakligen en lymfkörtel. Varje spridning efter detta stadium räknas till den postprimära delen. Spridningen sker då via blodet, en så kallad hematogen väg. Följderna av sjukdomen är olika beroende på vilket organ eller vävnad som bakterien infekterar.

Det finns olika faktorer som påverkar mottagligheten för tuberkulos. Om en människa är utsatt för ospecifika infektioner eller sjukdomar som i lag nedsätter allmäntillståndet kan det innebära ett sämre försvar mot sjukdomen. Människor som lider av exempelvis stafylokockinfektioner, mässling, alkoholism, HIV eller genomgår en kortisonbehandling har visat sig ha en lägre motståndskraft mot *M. tuberculosis* just eftersom immunförsvaret är sämre (Dahlström 1967).

Historiska fynd har visat att tbc är en av de äldsta dokumenterade sjukdomarna (Raviglione & O'Brien 2011). Detta har kunnat fastställas bland annat via fornegyptiska bildframställningar och mumier som visat sig varit drabbade av sjukdomen. Även dokument från Hippokrates har hittats, där han detaljerat har beskrivit de symptom som följer med tbc. Senare skelettfynd har visat att sjukdomen kom till Norden så sent som på 1000-talet (Swahn & Malmquist 2012).

Mycobacterium tuberculosis

År 1882 lyckades Robert Koch identifiera att det var *Mycobacterium tuberculosis* som gav upphov till tuberkulos hos människan (Ripe & Malmquist 2012). Bakterien tillhör familjen Mycobacteriaceae som omfattar över 100 mykobakteriearter, av vilken *M. tuberculosis* är en av de mest kända arterna (Grubb & Malmquist 2012).

Levnadsmiljö

Tillväxthastigheten i tuberkelbakterien är överlag långsammare än hos andra bakterier (Brooks & Carroll 2010) med en generationstid mellan 12-24 timmar (Ryan & Drew 2010). Organismen lever i en aerob miljö och har därför störst tillväxt i vävnader med hög syrekonzentration (Lawn & Zumla 2011). Vid sämre genomströmning av venöst blod vid lungans övre alveoler, minskar syreupptaget till blodet och således är O₂-konzentrationen relativt hög i dessa alveoler. Bakteriernas tillväxt gynnas därför främst i lungspetsen (Dahlström 1967). Således infekteras huvudsakligen lungor, men bakterien kan komma att angripa alla kroppens organ (Ringold 2008).

Egenskaper

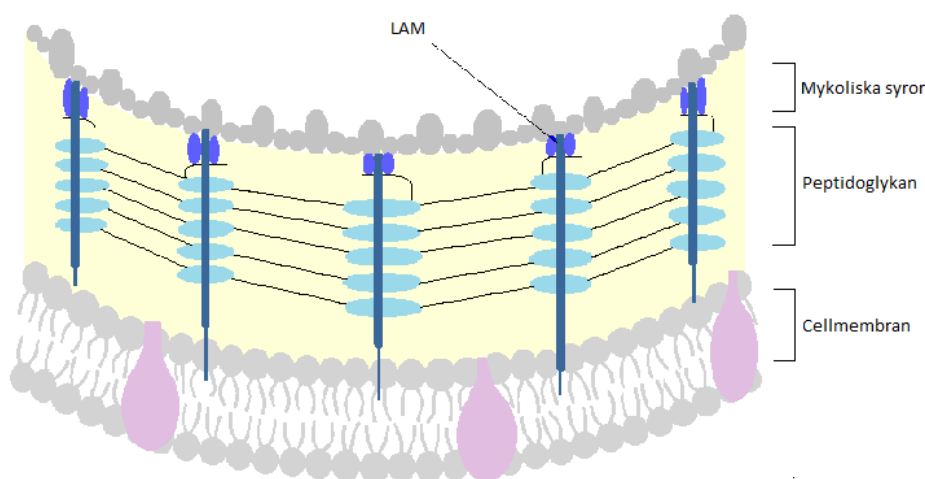
En vattenmolekyl i luften måste ha en partikel att fästa sig till för att bilda en vattendroppe, och kan därför binda till tuberkelbakterier som cirkulerar i luften. Dessa bakterier kan då vara känsliga mot ultraviolett ljus som bryts in mot vattendroppens mitt (där bakterien finns) och koncentreras, likt ett brännglas. *M. tuberculosis* kan då komma att inaktiveras av solljus (Ryan & Drew 2010).

Bakterien är motståndskraftig mot kyla och intorkning, men känslig för alkoholbaserade desinfektionsmedel samt värme (SMI 2012). Det sistnämnda kom att utnyttjas vid bekämpningsmetoder mot bakterien och ledde till att pastörisering av mjölk blev allt vanligare (se äldre behandlingstrategier). I motsats till andra bakterier producerar *M. tuberculosis* varken exotoxiner eller endotoxiner (Ryan & Drew 2010).

Strukturell uppbyggnad och transportreglering

År 1998 var genomet hos *M. tuberculosis* det näst störst sekvenserade, efter bakterien *Escherichia coli*. Detta var ett stort framsteg för att bättre förstå bakterien och således kunna utveckla nya behandlingsmetoder mot tuberkulos (Lawn & Zumla 2011). Bakteriens genom består av närmare 4,5 miljoner baspar (4 411 529) (Cole *et al.* 1998). Släktnamnet Mycobacterium kommer ifrån bakteriens höga halt av de långa fettsyorna vid namn mykoliska syror. Tillsammans med cellväggskomponenten lipoarabinomannan (LAM) utgör de ett lipidpolysackarid-komplex som sträcker sig från plasmamembranet till cellens utsida. Dessa beståndsdelar ger cellväggen ett ovanligt högt lipidinnehåll (mer än 60% av totala cellväggmassan), vilket ger mycket av dess biologiska karaktär (Ryan & Drew 2010).

Organismen har en stavliknande form och har en god motståndskraft mot syra. Dess syrafasthet beror just på de höga koncentrationerna av cellväggslipider och de mykoliska syrorna (se figur 1). Lipiderna binds samman med cellväggskomponenterna arabinogalaktan och peptidoglykan. Denna sammansättning förser cellen med en god barriär då cellväggen har låg permeabilitet (Raviglione & O'Brien 2011). Således tenderar mykobakterier att vara mer resistent mot kemikalier än andra bakterier (Brooks & Carroll 2010). Cellväggens hydrofoba egenskap leder bland annat till att bakterierna klumpar ihop sig, får en begränsad näringstillförsel och bidrar till den låga tillväxthastigheten (Ryan & Drew 2010).



Figur 1. Schematisk bild över cellväggsstrukturen hos *Mycobacterium tuberculosis*. Bilden är inspirerad ifrån Ryan & Drew (2010).

Mykobakteriens intracellulära koncentration regleras av ett samspel mellan cellens permeabilitet och ett så kallat inflödessystem. Eftersom cellväggen har en låg permeabilitet, regleras cellens ämnesupptagande därför av inflödespumpar och porformade proteiner. Denna reglering kan därmed stöta bort skadliga ämnen och således bidra till en antibiotikaresistens (Rodrigues *et al.* 2011).

Sjukdomens förlopp

Hur farlig sjukdomsprocessen är bestäms av balansen mellan två processer: i den ena så förstörs makrofagen (som inte är aktiverad) av bakterien och i den andra är det tvärtom, bakterien förstörs av den aktiverade makrofagen. Den första processen kan bara avläsas i huden som en långsam överkänslighetsreaktion (Ryan & Drew 2010). Mekanismen bakom mykobakteriens virulens är ännu inte fullt klarlagd men man har lyckats fastställa att bakteriella antigenen ESAT-6 och proteinet CFP10 är viktiga spelare mot värdens försvarsceller. Virulensen orsakas förmodligen av cytolys av alveolernas epitelceller samt av makrofager (Wang *et al.* 2009).

Organismens angrepp på lungan leder till slemproduktion eller exsudation, en så kallad inflammatorisk utsöndring av vätska i lungvävnaden. Det sistnämnda har en tendens att skapa smältning, vilket betyder att bakterierna dödas av de vita blodkropparna och ger upphov till varbildning. Om varet sedan hostas upp i bronkträdet och ersätts med luft uppstår således ett hålrum, en kavern, i lungan (Dahlström 1967). I kavernen kvarstår en icke-funktionell vävnad (Ripe & Malmquist 2012). Är inte alla tuberkelbakterier dödade av kroppens immunförsvar kan upphostningen dessutom leda till en spridning till andra delar av lungan. En slemproducerande tuberkulosinfektion resulterar i ett kroniskt tillstånd medan det exsudativa stadiet å andra sidan ger ett mer akut och värre förlopp (Dahlström 1967).

Följder av sjukdomen

Feber, avmagring och trötthet är klassiska allmänsymptom som kan väcka misstanke om tuberkulosinfektion. En långvarig blod- eller slemhosta brukar tala för att patienten i fråga kan vara drabbad av lungtuberkulos (SMI 2012). En bakteriell lunginfektion kan ge upphov till att lungans ventilationskapacitet nedsätts avsevärt, då på grund av ett sämre gasutbyte som främst

beror på en förstörd lungvävnad. Dessutom kan inflammatoriska svullnader leda till att de närliggande blodkärl pressas ihop vilket ger ett ökat motstånd i kärlen. Således ökar blodtrycket i det lilla kretsloppet (Dahlström 1967). Ett högt blodtryck kan i sin tur påverka hjärtat negativt, då i form av exempelvis hjärtsvikt i den högra kammaren.

Olika stadium

Beroende på en människas immunologiska respons på en infektion kan en tuberkulosinfektion förekomma i både aktiv- och passiv fas. Initialhärdar av de skadliga bakterierna kan förbli i stillastående fas i åtskilliga år innan världens allmäntillstånd försämras. Härdarna kan även tillbakabildas vilket ger ett periodvis förbättrat hälsotillstånd (Dahlström 1967). Detta kan bero på att kroppen har en förmåga att läka en tuberkulös lunginfektion genom att bakterierna kapslas in i lungans bindväv samt i lungportens lymfkörtlar (Ripe & Malmquist 2012). Trots att sjukdomen kan förekomma i olika former är det viktigt att diagnostisera infektionen eftersom det passiva stadiet lätt kan övergå till ett aktivt stadium (Ringold 2008).

Bakterier som överlever i en latent infektion visar vanligtvis en reducerad antibiotikakänslighet jämfört med bakterier som befinner sig i aktiv tillväxtfas. Exponering av antibiotika kan dessutom inducera en transformation av *M. tuberculosis* från ett aktivt stadium till ett passivt. Den huvudsakliga faktorn som bestämmer bakteriens passiva form är dess förmåga att överleva inuti infekterade celler (Wolff *et al.* 2009). Studier har visat att *M. tuberculosis* utsöndrar proteiner som gynnar deras överlevnad inuti makrofager samt förändrar immunresponsen hos patienten i fråga. Exempelvis har man identifierat att den bakteriella antigenen ESAT-6 hämmar världens T-celler (Wang *et al.* 2009) samt att det eukaryot-liknande *protein Kinase G* (pknG) är involverat i mykobakteriens överlevnad inuti makrofager. PknG antas blockera den lysosomala leveransen vilket hindrar bakterien från att hamna i lysosomen och bli förstörd (Wolff *et al.* 2009). Under gynnsamma förhållanden kan tuberkelbakterien överleva i latent form under personens hela livstid (SMI 2012).

Behandling av tuberkulosinfektioner

För att få bukt med tuberkulosinfektioner så att sjukdomen och dess utbredning reduceras, införde man olika behandlingsstrategier.

Äldre behandlingsstrategier

Eftersom tuberkelbakterierna sprids via luften och överlag drabbar människor med nedsatt immunförsvar förstod man vikten av hur viktig de sjuka människors omgivning var. Detta fick till följd att sanatorium infördes, och anlades i skogsområden. I Sverige byggdes det första sanatoriet redan år 1891 och var avsett huvudsakligen för vård av patienter som led av just tuberkulos. Behandlingen koncentrerades på ”hälsosam luft” som ansågs gynna patienternas läkningsprocess. Med anläggningarna lyckades man även isolera infektionssjukdomen och således begränsades smittorisken. I takt med minskade tuberkulosinfektioner avvecklades sanatorierna till slut (Swahn & Malmquist 2012).

Under 1940-talet introducerades olika antibiotikum som behandling mot tbc. Detta var ett stort framsteg i bekämpningen mot den bakteriella sjukdomen och medförde en stark reduktion av sjukdomen i västländer (Ripe & Malmquist 2012). Det ökade även möjligheterna till kirurgiska ingrepp för att bekämpa sjukdomen och kunde då innebära att den infekterade lungan avlägsnades helt alternativt de områden som var skadade (Dahlström 1967). Kirurgins roll inom lungtuberkulos var som störst i mitten av 50-talet, med ungefär 2000 årliga operationer i bara Sverige. I takt med att bättre mediciner, i form av effektivare antibiotika,

lanserades på marknaden minskade antal operationer då man såg goda resultat med enbart medicinering.

Pneumothoraxbehandling var en annan framgångsrik metod som innebar att lunsäckshålan fylldes upprepade gånger med antingen luft, syrgas eller kvävgas så att den infekterade lungan sammanföll (Swahn & Malmquist 2012). Detta ansågs vara ett effektivt sätt att döda bakterierna. Verkningsmekanismen är inte helt klarlagd men man kan anta att den anaeroba miljön i sammanfallna lungan var ogynnsam för tuberkelbakterien, som är beroende av syrgas för sin tillväxt. Efter behandlingarna kunde lungan så småningom återfå sin normala funktion. Komplikationer kunde dock uppstå vid exsudat eftersom lunsäcken förtjockades, vilket gav en nedsatt lungfunktion efter behandlingen (Dahlström 1967). Så småningom övergavs pneumothoraxbehandlingen men idag funderar man på att återuppta denna behandlingsform då nya studier visat goda resultat hos patienter som lider av resistent bakterier (Motus *et al.* 2006).

Bacille Calmette-Guérin-vaccinet (BCG) tillkom år 1927 och hade störst roll i att skydda barn mot sjukdomen. De utfördes rutinmässigt i Sverige på BB fram till 70-talet. Nu för tiden tilldelas vaccinationer bara till så kallade riskgrupper (SMI 2012). Dock har även deras effekter diskuterats. I tropiska länder har man inte funnit övertygande bevis på vaccinets positiva inverkan, medan man i nordiska länder har bedömt att BCG-vaccinet har minskat tbc-risken hos barn. Vidare forskning av nya vacciner har pågått under en lång tid. År 2011 hade dock man inte lyckats framställa ett mer effektivt vaccin än det tidigare BCG-vaccinet mot sjukdomen (Ripe & Malmquist 2012).

Andra insatser så som obligatorisk pastörisering av mjölk infördes för att minska bakterien *Mycobacterium bovis* utbredning (Swahn & Malmquist 2012). Denna mykobakterie orsakar främst tuberkulos hos djur och kan således infektera människor som dricker opastöriserad mjölk (Gunnarsson 2012).

Dagens behandling

Då många av de tidigare behandlingsstrategierna har avvecklats med åren använder man idag huvudsakligen antibiotika för att bota den kraftfulla *M. tuberculosis*. I och med de resistensproblem som finns används kombinationer av olika antibiotikum för att försäkra sig om att bakterierna dör och således kunna reducera de resistent bakterierna (Ripe & Malmquist 2012).

Att bota tuberkulos innefattar en lång behandlingstid (tre månader eller mer). Den långa behandlingstid har i många fall resulterat i en avbruten behandling, vilket då kan ge upphov till resistent bakterier. För att få bukt med detta använder man sig av metoden DOTS (eng. directly observed treatment, short-course), vilket innebär att patienten får sin medicin på sjukvårdsmottagningen och således observeras intaget av medicineringen av vårdpersonal. Nackdelen med detta kan vara att patienten i fråga kan ha långa transportsträckor för att nå sjukhuset, vilket kan medföra att behandlingen avbryts av patienten. I en undersökning år 1994-1995 visade det sig att endast var 71 % av svenska patienter som tillfrisknade inom 12 månader, tack vare fullföljd tuberkulosbehandling (Ripe & Malmquist 2012). Risken för återinsjunkande av en redan botad patient klassas som mycket liten (SMI 2012).

Antibiotika

Antibiotika är lösliga ämnen som produceras av organismer i syfte att inhibera bakteriers tillväxt (Gasbarre *et al.* 2012) utan att ha en större påverkan hos människan. Antibiotika är naturligt förekommande ämnen och det var vid 1900-talets början man förstod deras terapeutiska effekter. Den tyske medicinforskaren Paul Ehrlich lade grunden till antibiotikaforskningen då han, år 1910, upptäckte att antibiotikumet salvarsan kunde behandla syfilis. Vidare forskning av substanser av mikrobiellt ursprung resulterade i nya upptäckter av antibiotika som man sedan har lyckats framställa på artificiell väg (Norrby & Malmquist 2012).

Idag är antibiotika mycket framgångsrika läkemedel och används i stor utsträckning runtom i världen för att bota olika bakteriella infektioner. Projektet ESAC (eng. *European Surveillance of Antimicrobial Consumption*) sammanställde 2008 statistik över antibiotikaanvändningen i olika länder. De människor som dagligen använde antibiotika per 1000 invånare, var 1 % i Ryska federationen, 1,46 % i Sverige och 4,52 % i Grekland. Dock finns det en viss osäkerhet i rapporteringen, vilket beror på hur väl rapporteringen har skötts (WHO 2012 c).

Antibiotika klassificeras beroende på dess kemiska struktur samt hur den verkar på bakterien. De olika typerna av läkemedel kan antingen ha en bakteriostatisk eller en bakteriocid effekt. Detta innebär att bakteriens tillväxt förhindras utan att dö respektive att bakterien dödas (Gasbarre *et al.* 2012).

Antibiotikamekanismer

Antibiotika kan inhibera bakteriers tillväxt via fyra olika mekanismer. Det sker genom att antingen (1) inhibera bakteriens cellväggsyntes eller (2) interagera med antingen nyckelenzymerna i folsyrametabolismen, (3) proteinsyntesen eller (4) nukleinsyrasyntesen (Gasbarre *et al.* 2012).

För att eliminera *M. tuberculosis* används idag ett flertal antibiotika. Det antibiotikum som används första hand är antingen isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol eller pyrazinamid (se Antibiotikamekanismer och den utvecklade resistensen för detaljerad beskrivning av mekanismer). De sekundära antibiotikumen, aminoglykosid, polypeptid, fluoroquinoloner, thioamid, cykloserin och paraaminosalicylsyra, kan komma att användas men har en sämre effekt samt fler biverkningar på patienten (Mariam *et al.* 2011).

Resistensens utveckling

Att ur en klinisk synpunkt förstå vad resistens är och hur det utvecklas är viktigt eftersom det påverkar behandlingen av infektionssjukdomar och även mer avancerade terapeutiska processer som exempelvis transplantationer (Martinez 2012). Eftersom antibiotika härstammar från naturen är även antibiotikaresistensen en naturligt förekommande mekanism. Således är det alltså inte antibiotikaanvändningen i sig som har gett upphov till resistensens utveckling. Den har däremot utvecklats i takt med både ett ökat och misskött användande av drogen i fråga (WHO 2012 a). En alltför låg dos alternativt en för kort behandlingsskur kan leda till en ökad resistensutveckling (Norrby & Malmquist 2012). Tuberkulosbakterier med resistens mot ett eller flera antibiotika har sedan 1990-talet upptäckts runt om i världen (Ripe & Malmquist). I sjukhusmiljöer har så mycket som omkring 70 % av de bakterier som orsakar infektioner, utvecklat resistens mot åtminstone en typ av antibiotika (Gasbarre *et al.* 2012). I EU dör omkring 25 000 sjukhuspatienter varje år på grund av resistent bakteriella infektioner (WHO 2012 a).

Det finns olika klasser av resistens som beror på hur många antibiotika en mykobakterie är resistens mot: multidrogresistens (MDR), extensiv drogresistens (XDR) och total drogresistens (TDR). MDR innebär att bakterien är resistent mot två av de huvudsakliga drogerna som används i tbc-behandling (Amaral & Molnar 2012). XDR är en resistens mot delvis primära droger men även de sekundära (Lougheed *et al.* 2009). TDR är, precis som namnet avslöjar, totalt resistent mot alla droger.

Man har kunnat kartlägga fyra olika faktorer som påverkar resistensens utveckling. Det beror på (1) dagens antibiotikaanvändning (2) överlevnad, virulens och överföring av bakterien, (3) antal resistensmutationer och (4) antal mutationer som kan återställa virulens hos icke-virulenta resistensbakterier utan att resistensen går förlorad (Andersson *et al.* 1998).

Orsak och mekanismer

Mutationer förekommer i alla levande organismer. Om mutationer, som resulterar i en motståndskraft mot drogerna, förekommer hos bakterier som överlever antibiotikaangrepp utvecklas resistens. Det leder till att framtida bakteriegenerationer med denna motståndskraft selekteras fram. Resistensen kan antingen vara av kromosomal typ eller plasmidmedierad. Det förstnämnda innebär att resistensen finns i bakteriens genom och förs därför vidare till efterkommande generationer. En plasmidmedierad resistens däremot, betyder att den genetiska resistensinformationen finns i bakteriens plasmider och kan överföras till närliggande bakterier (Norrby & Malmquist 2012). *M. tuberculosis* resistensutveckling är enbart utav kromosomal typ (Mariam *et al.* 2011).

Det finns fem olika bakteriella mekanismer som skapar en resistens (Brooks & Carroll 2010):

1. Produktion av enzym som inaktiverar antibiotika
2. Permeabilitet gentemot drogen förändras
3. Strukturella måltavlor som antibiotika reagerar med förändras
4. Metabolismen förändras så bakterien kan undgå drogens inhiberande effekt
5. Enzymer förändras på så sätt att de fortfarande kan utföra deras metaboliska funktion men i sin tur påverkas mindre av antibiotika

Resistens hos mykobakterier

Den hydrofoba cellväggen hos mykobakterier är en effektiv barriär som motverkar inflödet av antibiotika och andra skadliga ämnen och kan därmed bidra till antibiotikaresistens (Wolff *et al.* 2009). Faktorer såsom kontrollerande porproteiner och inflödespumpar främjar antibiotikaresistens hos *M. tuberculosis* ytterligare eftersom de reglerar inflödet av ämnen som skall transporteras in i cellen. Exempelvis har studier visat att de mykobakteriella inflödespumpar som förekommer i cellväggen, var ett förstasteg i utvecklingen av resistensen mot antibiotikumet ethambutol (Schmalsteig *et al.* 2012). Bakteriens fitness har visat sig ha en betydelse av resistensens effekt och dess spridning. Effekten beror på var och hur bakteriens gen är muterad och kan variera från ingen effekt alls till reduktion i fitness. Exempelvis verkar de flesta mutationer i rifampicingenen *rpoB* reducera bakteriens fitness. Studier har visat att spridning av resistens mot isoniazid, rifampicin och streptomycin beror just på bakteriens fitness. (Mariam *et al.* 2011).

Resistensens nackdelar hos bakterier

Resistensutveckling brukar ofta anses som en gynnande egenskap hos bakterien, men studier visar att det även kan ha en negativ påverkan. Så trots att alarmerande studier visar att antibiotikaresistensen ökar och har förödande effekter, finns det faktorer som styrker hoppet om att komma underfund med och lösa problemet (Andersson *et al.* 1998).

Ett exempel på detta är att resistent bakterier antas växa långsammare än de bakterier som är icke-resistenta. Således kan det innebära att resistensbakterier i sinom tid kan utkonkurreras av de antibiotikakänsliga bakterierna (Spies *et al.* 2012). Teorin styrks exempelvis av en undersökning på Island där man har sett att resistensfrekvensen bland penicillinresistenta pneumokocker minskade som ett resultat av minskad antibiotikaanvändning (Andersson *et al.* 1998).

Resistens i sig kan dessutom innebära en kostnad för bakterien vilket kan betyda att essentiella processer hos bakterien förändras till det negativa (Spies *et al.* 2012). Exempelvis kan en förändrad ribosom leda till en långsammare proteinsyntes. Att dessutom bära plasmider och syntetisera de enzymer som inaktiverar antibiotika kan därmed innebära en extra kostnad för bakterien (Andersson *et al.* 1998).

Studier har visat att antibiotikaresistens generellt är irreversibel och således kan vi inte eliminera redan resistent bakterier. Dock är dessa studier baserade på ett begränsat antal resistenser och bakterier (främst bakterien *Escherichia coli*) och därför kan det finnas undantag som visar att bakterieresistens kan vara reversibel. Skulle en reversibel resistens vara fallet hos *M. tuberculosis* skulle det innebära att dess antibiotikaresistens är temporär, och således kan resistensproblemet inom sinom tid minska (Andersson *et al.* 1998).

Antibiotikamekanismer och den utvecklade resistensen

Antibiotika är, som ovan nämnt, verksamma genom totalt fyra olika mekanismer. De primära antibiotika som behandlar tuberkulosinfekterade människor verkar dock enbart genom två olika mekanismer: att inhibera mykobakteriens protein- och cellväggsyntes (se tabell 1).

Tabell 1. Tabellen illustrerar de antibiotikum som används mot infektionssjukdomen tuberkulos, deras mekanismer samt den utvecklade resistensen hos dessa droger (O'Donnell & Saukkonen 2011).

Antibiotikum	Mekanismer	Utvecklad resistens
Streptomycin (SM)	Binder till den ribosomala subenheten 30S och således inhiberas proteinsyntesen	Mutation i gener som antas vara involverade i bindningen mellan ribosom och SM: 16S rRNA-genen (<i>rrs</i>) eller genen som kodar för det ribosomala proteinet S12, <i>rpsL</i> . Mutation i genen <i>gidB</i> orsakar lågresistens.
Isoniazid (INH)	Används i kombination av andra droger. Saknar medicinsk effekt men omvandlas i kroppen till ett aktivt ämne. Aktiveras av enzymet mykobakteriell KatG katalas/oxididas. Aktiveringen ger delvis upphov till fria radikaler som verkar mot bakterien. INH tillsammans med NADH bildar ett komplex som blockerar ketoenylreduktas (<i>InhA</i>) och således inhiberas syntesen av fettsyra- och mykolisk syra.	Fyra olika mekanismer. Aminasyraändringar i antingen katalas-peroxididasgenen (<i>KatG</i>) eller <i>InhA</i> , modifiering av genen (<i>KasA</i>) som kodar för förlängning av mykoliska syror samt förlust av NADH dehydrogenas ger upphov till resistens.
Rifampicin (RIF)	Binder till RNA-polymeras och blockerar RNA-syntesen.	Mutationer i genen <i>rpoB</i> som kodar för subenheten av RNA-polymeraset.
Ethambutol (EMB)	Inhiberar arabinosyltransferas som är involverad i cellväggsyntesen. Detta antas inhibera formationen av arabinogalaktan och lipoarabinomannan.	Mutationer i genen <i>embB</i> , som kodar för arabinotransferas.
Pyrazinamid (PZA)	Saknar medicinsk effekt men omvandlas i kroppen till ett aktivt ämne, pyrazinoisk syra (POA). Konverteras till POA av mykobakteriellt pyrazinamidas och dess mekanism är oklar. Man tror dock att fettsyrsyntes I är involverad. POA är endast aktiv i sura miljöer (pH < 6.0)	Mutationer i genen <i>pncA</i> som kodar för pyrazinamidas.

Framtiden

Under de senaste åren har det lanserats få nya antibakteriella droger på marknaden, vilket beror på en för stor forskningskostnad kombinerat med att det redan finns dugliga läkemedel. Resistensproblemet har idag dock blivit för stort för att åsidosätta nya forskningsprojekt angående detta (Lougheed *et al.* 2009). Således arbetar man på att ta fram nya läkemedel och även andra kompletterande lösningar för att motverka problemet (Motus *et al.* 2006).

Tioridazin som behandlingsterapi

Forskare har under en lång tid studerat ämnet tioridazin (TZ), som visat sig ha en antibakteriell aktivitet. Tioridazin tillhör gruppen fenotiaziner som initialt utvecklades för att verka som antipsykotiska droger. I kombination med antibiotika, har TZ visats ha en god effekt mot *M. tuberculosis* oavsett dess antibiotikaresistens och man har med denna kombination lyckats bota infektioner med multiresistenta bakterier (Abbate *et al.* 2012).

Det unika med detta läkemedel är att det är makrofagen som utgör måltavlan istället för bakterien (Martins *et al.* 2008), utan att TZ verkar toxiskt mot makrofagen eller påverkar den cellulära immunresponser (Ordaway *et al.* 2003). Detta gör att makrofagens förmåga att döda de intracellulära bakterierna förstärks (Martins *et al.* 2008). Att man kan inrikta sig på makrofagen istället har inneburit en stor upptäckt och har skapat ett helt nytt koncept att utgå ifrån inom infektionsforskningen.

När en bakterie fagocyteras omges den av makrofagens membran som har ett in- och utflöde av K^+ - och Ca^{2+} -joner. Tioridazins verkningsmekanism antas vara att drogen förhindrar K^+ och Ca^{2+} från att transporteras ut ur den omslutna bakterien och tillbaka till makrofagens cytoplasma. Detta ökar H^+ -nivån i den fagosom som bakterien befinner sig i, vilket skapar en sur miljö. En surare miljö aktiverar då enzymer i lysosomerna som gör att de mycket lättare kan döda bakterien. På så sätt kan man förbipassera det skydd som bakterien skaffat sig i och med resistensutvecklingen mot olika antibiotika (Martins *et al.* 2008).

Emellertid har man kunnat påvisa vissa bieffekter på hjärtat och således återstår mycket forskning innan man kan bestämma huruvida TZ skall klassas som en säker drog eller inte. Effekterna är dock så pass sällsynta att drogen ändå ses som en potentiell kandidat i bekämpandet av multiresistenta tuberkelbakterier (Ordaway *et al.* 2003). I en studie av Abbate *et al.* har man exempelvis inte funnit någon negativ hjärtpåverkan eller QT-förlängning (elektrisk ledningstid i hjärtmuskeln) hos patienter som behandlats med drogen i fråga. TZ verkar istället ha haft positiva bieffekter då många patienters ångest minskade samt att de fick en ökad aptit och vikt. Negativa bieffekter kunde i denna studie motverkas genom att justera drogmängden (Abbate *et al.* 2012)

Återuppta äldre behandlingsmetoder

En nyligen publicerad studie av Motus *et al.* (2006) har visat mycket goda resultat mot tuberkulossjukdomen med en tidigare mycket använd men på senare tid avlagd metod, nämligen artificiell pneumothorax (AP).

I denna studie (se tabell 2) ingick 214 patienter med lungtuberkulos. Av dessa visade sig 78,9 % vara multiresistenta mot antibiotika. Alla 214 patienter fick fortsatt medicinsk behandling mot tbc, men delades sedan upp i en kontrollgrupp och en försöksgrupp. Kontrollgruppen (105 patienter) fick bara medicinsk behandling medan försöksgruppen (109 patienter) fick

både medicinsk- och AP-behandling. Utifrån dessa resultat diskuteras ifall man skall ta upp denna behandlingsform återigen (Motus *et al.* 2006).

Tabell 2. Resultat av pneumothoraxbehandling genomförda av Motus *et al.* 2006.

Gruppindelning	Antal patienter	Behandlingshistorik	Tid (månader)	Andel tuberkulosfria (%)
Kontroll A	55	-	4,5	71
Kontroll B	50	Tidigare behandlad	9	40
Försök A	56	-	4,5	100
Försök B	53	Tidigare behandlad	9	81

Diskussion

Syftet med denna litteraturuppsats är att undersöka om och i vilken utsträckning antibiotikaresistens hos *Mycobacterium tuberculosis* bör anses som oroväckande för människan. Om ja, hur stort är problemet och vad kan man göra åt det? Den första frågan man ställer sig är förstås om resistensen kan komma att gå tillbaka eller reduceras?

Kan resistensen vara reversibel? Studier när det gäller malariaparasitens resistens mot drogen klorokin (Mang'era *et al.* 2012), antyder att så skulle kunna vara fallet. Min tanke är att om en mutation orsakar att bakterien får en motståndskraftig egenskap kan ytterligare en mutation återställa den första mutationen som skapade resistensen. Då mutationer sker spontant är sannolikheten att mutation nummer två sker på samma baspar (bp) väldigt liten, men rent teoretisk möjlig. Skulle det krävas tre samordnade basparsmutationer för att skapa resistens gäller teorin även här. Detta eftersom det räcker att ett av dessa bp muterar tillbaka till den ursprungliga basen för att resistensen skall upphöra då bara finns två mutationer kvar (krävs tre för resistens). Om resistensen å ena sidan skapas av mutationer som tar bort eller infogar ett baspar är en reversibel resistens mer osannolik.

Kan resistensen reduceras och i sådana fall hur? Idag känner vi till bakteriens genom, vilket indikerar att vi har en god insikt i hur bakterien är uppbyggd samt verkar. Det ger oss goda möjligheter att utveckla nya behandlingsmetoder varav många läkemedel, med nya angreppsmekanismer, redan är under utveckling. Detta ger oss ett hopp om att i framtiden kunna komma förbi den nuvarande resistensen hos *M. tuberculosis*. Hur privatpersoner genomför de av läkare ordinerade antibiotikakurerna har också stor betydelse för utveckling av antibiotikaresistens, vilket har bekräftats av studier (WHO 2012 a). Man har exempelvis visat att en minskad antibiotikaanvändning har lett till en reducerad resistensfrekvens eftersom vi undgår ett selektionstryck samt att de resistenta bakterierna kan utkonkurreras av de antibiotikakänsliga. I en antibiotikafri miljö kan således bakterierna återgå till en icke-resistent population. Läkare som ordinerar antibiotika och patienter som brukar drogerna måste öka sin kunskap inom området och förstå sitt ansvar. Båda parter måste sköta sitt för att tuberkelbakterien inte överlever och utvecklar ytterligare en resistens mot ett nytt antibiotika. Tar alla sitt ansvar tror jag att vi har kommit en lång bit på vägen.

Idag använder man ofta kombinationer av antibiotika för att kunna bekämpa multiresistenta bakterier. För tuberkelbakterien kan en kombination av två-fyra olika antibiotika vara en vinnande behandlingsstrategi (SMI 2012), men det räcker inte alltid. Finns det någon sannolik övre gräns för hur många resistenser, som multiresistenta tuberkelbakterier kan utveckla? Skulle man kunna klara alla tbc-infektioner genom att kombinera med flera antibiotika, till exempel 6-7 stycken?

Den andra frågan man ställer sig är om man kan hitta kompletterande lösningar till antibiotika för att eliminera bakterien? Då vi känner till att tuberkelbakterien är känslig för värme och för desinfektionsmedel, säkerligen utnyttja detta för att reducera deras skadeverkningar. Man har hittills lyckats minska bakteriens utbredning tack vare obligatorisk pastörisering och således bör mer forskning ägnas åt studier inom detta område. Exempelvis använder man idag värmebehandling vid viss typ av tumörbekämpning (Bhayani *et al.* 2012) och något liknande skulle kanske kunna användas också mot tuberkelbakterien.

Kan man utnyttja äldre och avverkade behandlingsterapier för att eliminera bakterien? Trots att avverkade behandlingsmetoders verkliga effekt i efterhand har diskuterats, kan det vara värt att undersöka deras effekt noggrannare. Att återuppta BCG-vaccinationer kanske är ett steg i rätt riktning? Att återgå till koncepten ”hälsosam luft” kanske man inte kan åstadkomma någon reduktion av sjukdomen, men med sanatorium kan man åtminstone begränsa sjukdomen. Metoden pneumothorax har ju använts i tidigare strategier och ansågs då ha varit en framgångslinje trots att det idag är svårt att få fram säkra data på behandlingsresultat och verkningssätt. Motus *et al.* kunde dock i sin studie (2006) påvisa överlägsna behandlingsresultat hos patienter med multiresistens om detta kombinerades med pneumothoraxbehandling från 4,5 till 9 månader. De goda resultaten talar dock för sig själva och kanske kan det bli en pånyttfödelse av en gammal metod i särskilt svåra multiresistenta fall.

Ytterligare en möjlighet är att inrikta sina ansträngningar på att stärka kroppens eget immunförsvar. Det har visat sig att tuberkelbakterien har förmåga att överleva i makrofagen genom att utsöndra ämnen som blockerar makrofagens utveckling och sammansmältning med lysosomen. Tioridazin (TZ), som tidigare använts för behandling av psykiska sjukdomar har visat sig kunna häva denna blockad och göra att den fagocyterade tuberkelbakterierna dödas av lysosomala enzym. En kombination av antibiotika och TZ är därför en möjlig framtidsstrategi.

Slutligen får vi se det positiva i det hela. Det kunde ha varit värre. *Mycobacterium tuberculosis* överför de resistenta generna till sina släktingar, och måste alltså ärvas för att spridas. Hade den varit av både kromosomal typ och av plasmidmedierad typ hade distributionen av de gynnande generna kunnat vara enorm. Detta i kombination med deras långsamma tillväxthastighet indikerar att det alltså hade kunnat vara värre.

För att sammanfatta denna litteraturstudie ställer jag mig frågan: Är resistensen ett hot? Svaret kan inte svaras med ett enkelt ja eller nej. Det är absolut en hotbild värd att ta på allvar, men framtiden ser kanske inte så mörk ut som man hade kunnat tro.

Tack

Stort tack till dem som har hjälpt mig under arbetets gång. Opponenterna Johanna Sköld och Dardan Konjusha, handledare Jan Andersson och sist men inte minst kursansvarige Jan Örberg.

Referenser

- Abbate E, Vescovo M, Natiello M, Cufre M, Garcia A, Montaner PG, Ambroggi M, Ritacco V, van Soolingen D. 2012. Successful alternative treatment of extensively drug-resistant tuberculosis in Argentina with a combination of linezolid, moxifloxacin and thioridazine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**: 473-477
- Amaral L, Molnar J. 2012. Why and how thioridazine in combination with antibiotics to which the infective strain is resistant will cure totally drug-resistant tuberculosis. *Expert Reviews* **8**: 869-873.
- Andersson D, Björkman J, Hughes D. 1998. Antibiotikaresistens här för att stanna? *Läkartidningen* **95**: 3940-3944.
- Bhayani KR, Rajwade JM, Paknikar KM. 2012. Radio frequency induced hyperthermia mediated by dextran stabilized LSMO nanoparticles: in vitro evaluation of heat shock protein response. *Nanotechnology* **24**:1-8.
- Brooks G, Carroll C. 2010. Antimicrobial chemotherapy. I: Brooks G, Carroll C, Butel J, Morse S (red.). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*, 25:e upplaga. McGraw-Hill Medical, New York.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, 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. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Dahlström G. 1967. Tuberkulos. I: Birath G (red.). *Lungsjukdomar*, s. 54-84. Almqvist & Wiksell förlag AB, Stockholm.
- Gasbarre C, Schmitt S, Tomecki K. 2012. Antibiotics. I: Goldsmith L, Katz S, Gilchrist B, Paller A, Leffell D, Wolff K (red.). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 8:e upplaga. McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York.
- Gunnarsson A. 2012. Tuberkulos. <http://www.ne.se/lang/tuberkulos>. Hämtad 2013-01-11.
- Grubb R, Malmquist J. 2012. Mykobakterier. <http://www.ne.se/lang/mykobakterier>. Hämtad 2012-12-09.
- Lawn S, Zumla A. 2011. Tuberculosis. *The Lancet* **378**: 57-72.
- Lougheed K, Taylor D, Osborne S, Bryans J, Buxton R. 2009. New anti-tuberculosis agents amongst known drugs. *Tuberculosis* **89**: 364-370.
- Maitra A, Kumar V. 2007. The Lung. I: Kumar V, Robbins S (red.) *Robbins Basic Pathology*, 8:e upplaga, ss 516-528. Saunders/Elsevier, Philadelphia PA.
- Mang'era C, Mbai F, Omedo I, Mireji P, Omar S. 2012. Changes in genotypes of *Plasmodium falciparum* human malaria parasite following withdrawal of chloroquine in Tiwi, Kenya. *Acta Tropica* **123**: 202-207.
- Mariam S, Werngren J, Aronsson J, Hoffner S, Andersson D. 2011. Dynamics of Antibiotic Resistant *Mycobacterium tuberculosis* during Long-Term Infection and Antibiotic Treatment. *PLoS ONE* **6**: 1-8.

- Martinez J. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology* **3**: 1-3
- Martins M, Viveiros M, Amaral L. 2008. Inhibitors of Ca²⁺ and K⁺ Transport Enhance Intracellular Killing of *M. tuberculosis* by Non-killing Macrophages. *In vivo* **22**: 69-76.
- Motus IY, Skorniakov SN, Sokolov VA, Egorov EA, Kildyusheva EI, Savel'ev AV, Zaletaeva GE. 2006. Reviving an old idea: can artificial pneumothorax play a role in the modern management of tuberculosis? *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **10**: 571-577.
- Norrby R, Malmquist J. 2012. Antimikrobiell behandling. <http://www.ne.se/lang/antimikrobiell-behandling>. Hämtad 2012-11-19.
- O'Donnell M, Saukkonen J. 2011. Antimycobacterial agents. I: Longo D, Kasper D, Jameson JL, Fauci A, Hauser S, Loscalzo J (red.). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18:e upplaga. McGraw-Hill Medical, New York.
- Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Bettencourt R, Almeida J, Martins M, Kristiansen JE, Molnar J, Amaral L. 2003. Clinical Concentrations of Thioridazine Kill Intracellular Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 917-922.
- Raviglione M, O'Brien R. 2011. Tuberculosis. I: Longo D, Kasper D, Jameson JL, Fauci A, Hauser S, Loscalzo J (red.). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18:e upplaga. McGraw-Hill Medical, New York.
- Ringold S. 2008. Tuberculosis. *JAMA* **300**: 464.
- Ripe E, Malmquist J. 2012. Tuberkulos. <http://www.ne.se/lang/tuberkulos>. Hämtad 2012-11-19.
- Rodrigues L, Ramos J, Couto I, Amaral L, Viveiros M. 2011. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiology* **11**:35.
- Ryan K, Drew W. 2010. *Mycobacteria*. I: Ryan K, Ray G (red.). Sherris Medical Microbiology, 5:e upplaga. McGraw-Hill Medical, New York.
- Schmalstieg A, Srivastava S, Belkaya S, Deshpande D, Meek C, Leff R, van Oers N, Gumbo T. 2012. The Antibiotic Resistance Arrow of Time: Efflux Pump Induction Is a General First Step in the Evolution of Mycobacterial Drug Resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **56**: 4806-4815.
- Smittskyddsinstitutet (SMI). 2012. Tuberkulos. WWW-dokument: 2012-03-07. <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/tuberkulos/>. Hämtad 2012-12-08.
- Spies F, von Groli A, Ribeiro A, Ramos D, Ribeiro M, Costa ERD, Martin A, Palomino JC, Rossetti ML, Zaha A, da Silva PE. 2012. Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rrs*, *rpoB*, and *katG* genes. *Tuberculosis*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2012.11.004>.
- Swahn J-Ö, Malmquist J. 2012. Tuberkulos. <http://www.ne.se/lang/tuberkulos>. Hämtad 2012-11-19.
- Wang X, Barnes P, Dobos-Elder K, Townsend J, Chung YT, Shams H, Weis S, Samten B. 2009. ESAT-6 Inhibits Production of IFN- γ by *Mycobacterium tuberculosis*-Responsive Human T Cells. *The Journal of Immunology* **182**: 3668-3677.
- WHO 2012 a. World Health Organization. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/antibiotic-resistance>. Hämtad 2012-11-18.
- WHO 2012 b. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2012*. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

WHO 2012 c. World Health Organization. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/facts-and-figures>. Hämtad 2012-11-18.