

# Zastosowanie testu GenoType MTBDRplus do wykrywania oporności na izoniazyd i ryfampicynę w szczepach klinicznych *Mycobacterium tuberculosis* izolowanych w Pakistanie

**Autorzy:** Tomasz Jagielski<sup>1</sup>, Zofia Bakula<sup>1</sup>, Hasnain Javed<sup>2</sup>, Małgorzata Pleń<sup>1</sup>, Nazia Jamil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska

<sup>2</sup>Department of Microbiology & Molecular Genetics, University of the Punjab, Lahore, Pakistan

## Wprowadzenie:

Molekularny test GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Germany) pozwala na oznaczanie oporności prątków gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*) na izoniazyd (INH) i ryfampicynę (RMP), dwa kluczowe leki stosowane w terapii gruźlicy. Identyfikacja oporności na INH opiera się na detekcji mutacji w genie *katG*, kodującym białko katalazy/peroksydazy, niezbędnej do otrzymania aktywnej farmakologicznie formy leku oraz w regionie promotorowym genu *inhA*, kodującego reduktazę enoilo-ACP, enzym zaangażowany w syntezę kwasów mykolowych. Z kolei, oporność na RMP wynika z obecności mutacji w tzw. regionie RRDR (ang. *rifampicin resistance determining region*) genu *rpoB*, kodującego podjednostkę  $\beta$  polimerazy RNA stanowiącej molekularny cel działania RMP.

Celem pracy była ocena użyteczności testu GenoType MTBDRplus do wykrywania oporności na INH i RMP wśród szczepów *M. tuberculosis* o wielolekooporności typu MDR (ang. *multidrug resistance*), wykazanej przy użyciu metod fenotypowych.

## Materiał i metody:

Do badania włączono 100 szczepów *M. tuberculosis* wyizolowanych od chorych na gruźlicę typu MDR w Pakistanie w 2014 roku. Wrażliwość na INH i RMP badana była metodą proporcji na pożywce Löwenstein'a-Jensen'a (L-J), przy stężeniach krytycznych INH i RMP wynoszących, odpowiednio: 0,2 mg/L i 40 mg/L. Chromosomowy DNA izolowano z kolonii prątków na pożywce L-J, wg metody wykorzystującej bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB). Test GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Germany) wykonywano ściśle wg instrukcji załączonej przez producenta.

## Wyniki:

Przy użyciu testu GenoType MTBDRplus mutacje w genie *katG* (G944C, Ser315Thr) wykryto w 66 badanych szczepach. Pozostałe 34 szczepy zakwalifikowane zostały jako posiadające „dziką” kopię genu. Mutacje w regionie promotorowym genu *inhA* stwierdzono w 10 szczepach (mutację C-15T zidentyfikowano w 10 szczepach, a mutację T-8C – dodatkowo w 2 szczepach). 77 szczepów posiadało zmutowaną wersję genu *rpoB*. Wykryte mutacje należały do 4 rodzajów: C1349T (Ser450Leu), A1304T (Asp435Val), C1333G (His445Asp) i TC1324CA (Ser441Gln) i występowały odpowiednio w 63, 11, 8 i jednym szczepie. Spośród 100 szczepów oznaczonych jako MDR metodą fenotypową tylko, jedynie dla 62 potwierdzono ten fenotyp stosując test GenoType MTBDRplus. Wyniki oznaczeń obiema metodami były zgodne w 70% (70/100) dla INH i 77% (77/100) dla RMP.

## Dyskusja:

Test GenoType MTBDRplus charakteryzuje się stosunkowo wysoką częstością wyników fałszywie ujemnych. W porównaniu z metodą konwencjonalną oznaczania lekowrażliwości, test GenoType MTBDRplus nie był w stanie wykryć 30 (30/100; 30%) szczepów opornych na INH i 23 (23/100; 23%) szczepów opornych na RMP. Łącznie, dla 38 (38/100; 38%) szczepów o oporności typu MDR (wg metody proporcji), fenotyp ten nie został potwierdzony testem GenoType MTBDRplus. Oporność na INH lub RMP w tych szczepach jest najprawdopodobniej wynikiem mutacji w innych genach lub regionach genów niż te uwzględnione w teście komercyjnym. Do wykrywania oporności prątków *M. tuberculosis* na INH i RMP, szczególnie w krajach o wysokiej prevalencji gruźlicy, takich jak Pakistan, metody molekularne powinny stanowić jedynie uzupełnienie a nie zastępnik metod konwencjonalnych.

**Słowa kluczowe:** *Mycobacterium tuberculosis*; GenoType MTBDRplus; *katG*; *inhA*; *rpoB*