

BADANIE LEKOWRAŻLIWOŚCI *MYCOBACTERIUM KANSASII* METODĄ MIKROROZCIEŃCZEŃ ORAZ PRZY UŻYCIU PASKÓW E-TEST

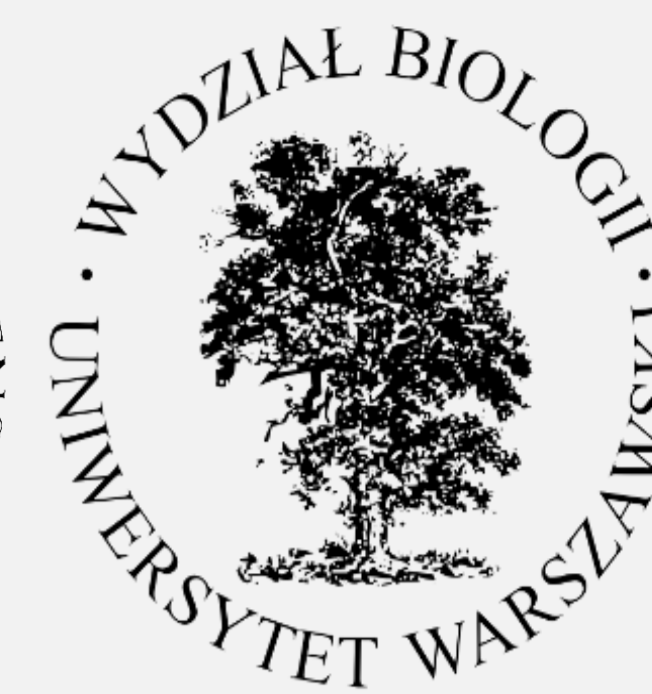
Zofia Bakuła¹, Magdalena Modrzejewska¹, Lian Pennings²,
Aleksandra Safianowska³, Małgorzata Proboszcz³, Justyna Kościuch³,
Jakko van Ingen², Rafał Krenke³, Tomasz Jagielski¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Polska

²Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Center, Holandia

³Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska

Badanie zostało sfinansowane ze środków przyznanych grantem NCBiR «LIDER» (LIDER/044/457/L-4/12/NCBR/2013).



WSTĘP

Prątki *Mycobacterium kansasii* (Ryc. 1) należą do wolnorosnących prątków niegruźliczych (NTM, ang. *nontuberculous mycobacteria*), wywołujących oportunistyczne zakażenia u ludzi i zwierząt. Zwykle manifestują się w postaci przewlekłej choroby płuc, o obrazie klinicznym imitującym gruźlicę. W Europie, Polska zajmuje po Słowacji drugie miejsce pod względem częstości izolacji *M. kansasii* z próbek klinicznych (36% izolowanych prątków NTM to prątki *M. kansasii*). Zarówno dla *M. kansasii*, jak i innych prątków NTM wciąż brakuje danych dotyczących lekowrażliwości oraz wystandaryzowanych metod jej oznaczania. Nie znane są także molekularne podstawy oporności *M. kansasii* na leki.

CEL

Celem pracy było określenie wrażliwości szczepów klinicznych *M. kansasii* na powszechnie stosowane w terapiach przeciwprątkowych leki, dwiema metodami tj. referencyjną metodą mikrorozcieńczeń oraz gradientowo dyfuzyjną, przy użyciu pasków E-test. Dodatkowo, starano się rozpoznać molekularne determinanty oporności *M. kansasii* na leki, poszukując w wybranych genetycznych loci mutacji warunkujących lekooporność w szczepach *M. tuberculosis*.

MATERIAŁY I METODY

Badanie objęło 62 szczepy *M. kansasii* wyizolowane w latach 2000-2015 w Szpitalu Klinicznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badane szczepy pochodziły od pojedynczych pacjentów (40 kobiet i 22 mężczyzn; przekrój wiekowy: 21-89 lat; średnia wieku: 64±18 lat). Do badania włączono także 23 szczepy reprezentujące różne typy genetyczne *M. kansasii* (I-VI; I/II; I/IB), pochodzenia klinicznego (17) lub środowiskowego (6). Z przypadków potwierdzonej mykobakteriozy pochodziło 48 (60.7%) szczepów.

Oznaczenia wykonano dla 13 leków (rifampicyna, RIF; klarytromycyna, CLR; izoniazyd, INH; etambutol, EMB; streptomycyna, STR; amikacyna, AMK, kotrimoksazol, SXT; rifabutyna, RFB; moksifloksacyna, MXF; linezolid, LZD; ciprofloksacyna, CIP; doksycyklina, DOX; etionamid, ETO) metodą mikrorozcieńczeń w systemie SLOMYCO Sensititre® (TREK Diagnostic Systems, USA), zaś dla 8 leków (RIF; CLR; INH; EMB; STR; AMK; SXT i kanamycyna, KAN) – przy użyciu komercyjnie dostępnych pasków E-test (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francja). Krytyczne stężenia leków stosowane w metodzie mikrozcieńczeń były odpowiadały wytycznym Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI).

Analizę sekwencyjną przeprowadzono w 6 loci tj. *rrl* (CLR), *katG* (INH), *rpsL* (STR), *rrs* (AMK, KAN i STR), *gyrA* i *gyrB* (CIP) dla szczepów opornych na dany lek lub, w wypadku braku krytycznych stężeń dla 5 szczepów o najwyższej i najniższej wartości MIC (ang. *minimum inhibitory concentration*). Dla przedstawicieli typów genetycznych (I-VI; I/II; I/IB) sekwencjonowano regiony *embB* i *embCA* (EMB).

WYNIKI

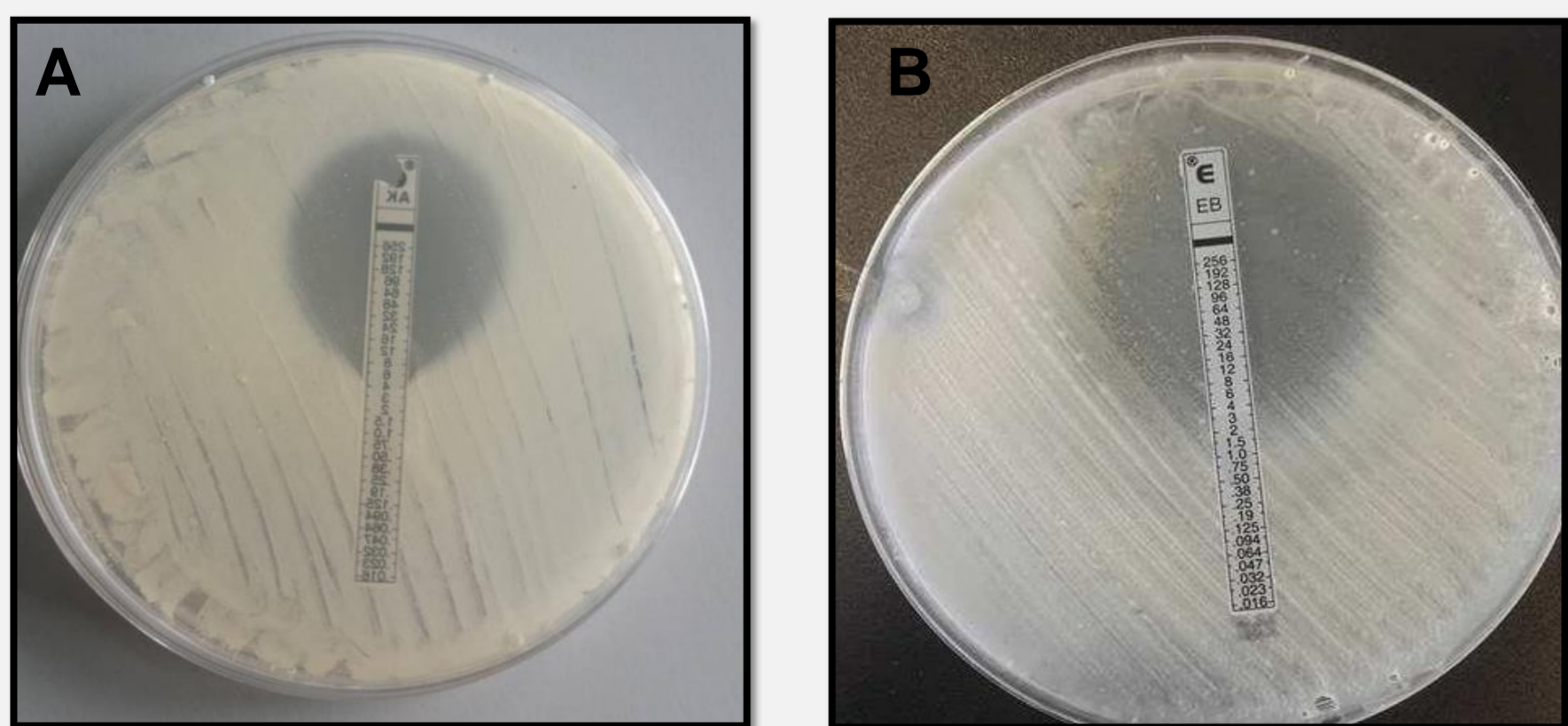
Wszystkie badane szczepy okazały się wrażliwe na RIF, AMK, SXT, RFB, MOX i LZD. Liczba szczepów opornych na EMB, CIP i CLR wyniosła odpowiednio: 83 (97,7%), 16 (18,8%) i 1 (1/85; 1,2%).

Mediana MIC dla leków bez ustalonych krytycznych stężeń wyniosła odpowiednio: 2 mg/L (INH); 8 mg/L (STR); 8 mg/L (DOX); <0.3 mg/L (ETO).

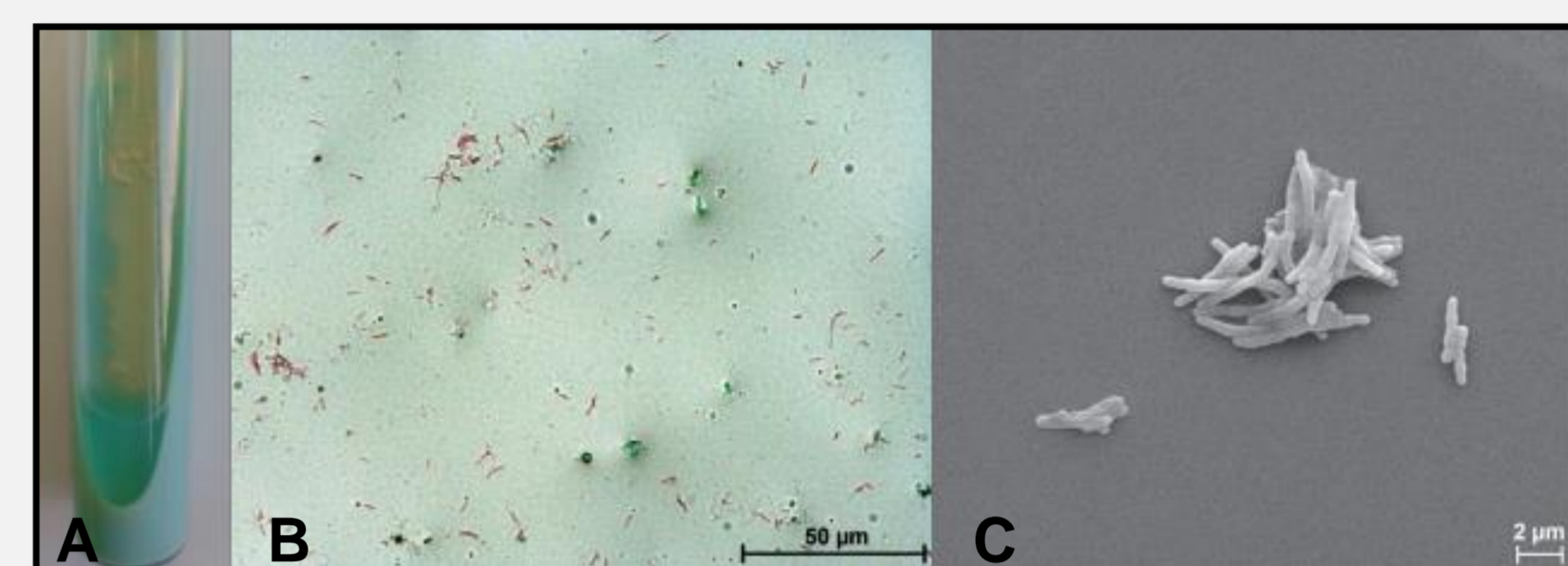
Mediana MIC określona metodą rozcieńczeń znacząco różniła się od tej oznaczonej paskami E-test (P<0.001). Zgodność oznaczeń pomiędzy dwoma testami wyniosła 22,5% dla AMK, 4,8% dla STR, 3,2%

dla CLR i 1,6% dla RIF. Żaden z wyników MIC nie był zgodny dla EMB, INH i SXT (Ryc. 3).

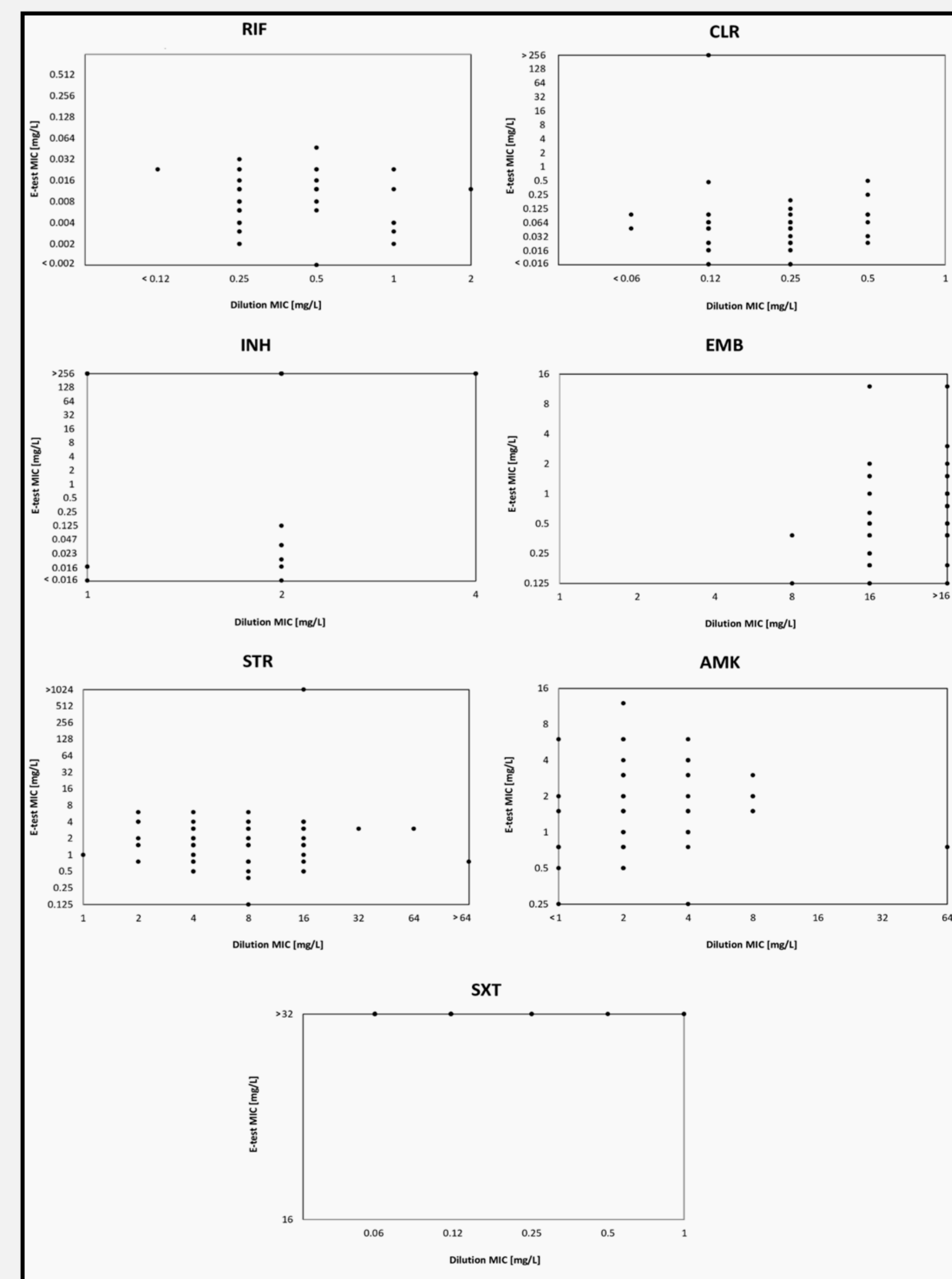
Zidentyfikowano jedynie dwie mutacje, tj. A2266C w genie *rrl* w szczepie opornym na CLR oraz A128G w genie *rpsL* w szczepie o wysokim MIC (>64 mg/L) dla STR. Mutacje te mogą stanowić markery oporności na oba leki w szczepach *M. kansasii*.



Ryc. 2. Badanie E-test dla *M. kansasii* (A. AMK, MIC=4 mg/L; B. EMB MIC=16 mg/L).



Ryc. 1. Prątki *M. kansasii* na pożywce Löwenstein'a-Jensen'a (A); szczegóły morfologii w obrazie mikroskopii świetlnej (pow. 40x) (B) i skaningowej (SEM; pow. 5000x) (C)



Ryc. 3. Wykres punktowy porównujący wyniki MIC uzyskane metodą rozcieńczeń (dilution MIC) i z użyciem pasków E-test (E-test MIC).

WNIOSKI

- Otrzymane wyniki wskazują na wysoką wrażliwość szczepów klinicznych *M. kansasii* na RIF, CLR, AMK, SXT, RFB, MXF, LZD i ETO.
- Wyniki oznaczeń lekowrażliwości przy pomocy pasków E-test są dalece rozbieżne z wynikami otrzymanymi w metodzie rozcieńczeń.
- Dla 16 szczepów *M. kansasii* opornych na CIP nie wykryto mutacji wiązanych z opornością na te leki w szczepach *M. tuberculosis*. Wskazuje to na inne mechanizmy lekooporności.
- We wszystkich szczepach wybranych jako reprezentujące typy genetyczne (także w szczepie wrażliwym na EMB, należącym do typu V) zidentyfikowano zmianę nukleotydową G918C (aminokwasową: M306I) w regionie determinującym odporność na EMB (ERDR) w *M. tuberculosis*.