

## WSTĘP

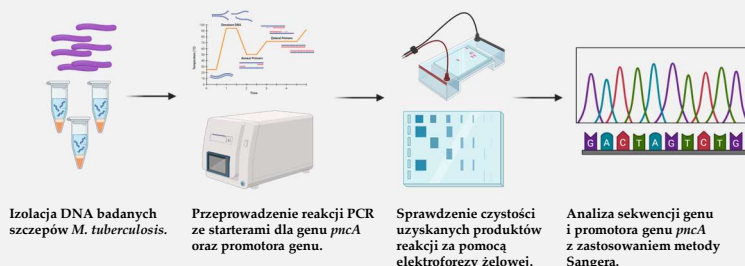
- Prątki *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) są czynnikiem etiologicznym gruźlicy. Podczas infekcji, w organizmie człowieka prątki przebywają zarówno w formie uśpionej – w kwaśnym środowisku tzw. fagolizosomów znajdujących się w makrofagach płucnych oraz aktywnej metabolicznie dzieląc się i prowadząc do ekspansji choroby.
- Największym zagrożeniem w realizacji programów zwalczania gruźlicy jest zjawisko wielolekooporności prątków, a w szczególności gruźlicy typu MDR, pre-XDR i XDR. W 2021 roku definicje gruźlicy wielolekoopornej pre-XDR i XDR ze względu na zmianę schematów leczenia uległy zmianie. W pracy większość analizowanych szczepów została wyizolowanych przed zmianą definicji, dlatego analizę oparto o definicje obowiązujące w tamtym okresie tj.
  - MDR TB – prątki odporne na przynajmniej izoniazyd i ryfampicynę
  - pre-XDR TB – prątki MDR z dodatkową opornością na przynajmniej jeden lek z grupy fluorochinolonów lub aminoglikozydów.
  - XDR TB – prątki MDR z dodatkową opornością na przynajmniej jeden lek z grupy fluorochinolonów oraz przynajmniej jeden lek z grupy aminoglikozydów.
- Pirazynamid (PZA) jest chemioterapeutykem stosowanym w podstawowych schematach terapii gruźlicy. Wykazuje aktywność jedynie wobec form uśpionych, w kwaśnym pH około 5,5. Ma działanie bakteriobójcze i jest prolekiem.
- Kluczowym enzymem metabolizującym pirazynamid do formy aktywnej – kwasu pirazynowego, jest pirazynamidaza (nikotynamidaza), kodowana przez gen *pncA*.
- Wykazano, że oporność na pirazynamid ma związek z mutacjami w obrębie genu *pncA*.

## CEL PRACY

- Analiza fenotypu i genotypu szczepów *Mycobacterium tuberculosis* opornych na pirazynamid, które zostały wyizolowane od chorych w latach 2019-2021.

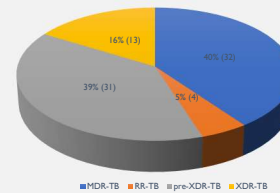
## MATERIAŁY I METODY

- Badania zostały przeprowadzone na szczepach *M. tuberculosis*, które zostały wyizolowane od 80 chorych na gruźlicę oporną na pirazynamid.
- Wszystkie szczepy poddano pełnej analizie mikrobiologicznej, poprzez identyfikację gatunkową i określenie fenotypu oporności na podstawowe (ryfampicynę, izoniazyd, etambutol, streptomycynę), i dodatkowe leki przeciwprątkowe (lewofloksacynę, moksyflokscynę, kapreomycynę, kanamycynę, amikacynę).
- W kolejnych etapach badań szczepom wyznaczono wartość MIC PZA, z zastosowaniem metody mikrorozcieńczeń oraz przeprowadzono analizę sekwencyjną genu *pncA* metodą Sangera.

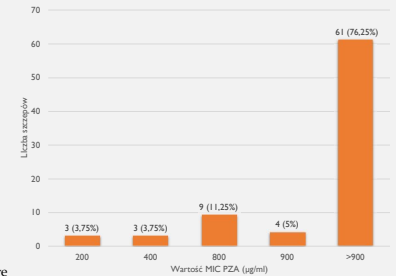


## WYNIKI

- W analizowanej grupie 80 szczepów *Mycobacterium tuberculosis* opornych na pirazynamid, stwierdzono, że 40% (32) szczepów posiada fenotyp typu MDR-TB, 39% (31) pre-XDR-TB, a 16% szczepów XDR-TB (Wykres 1).

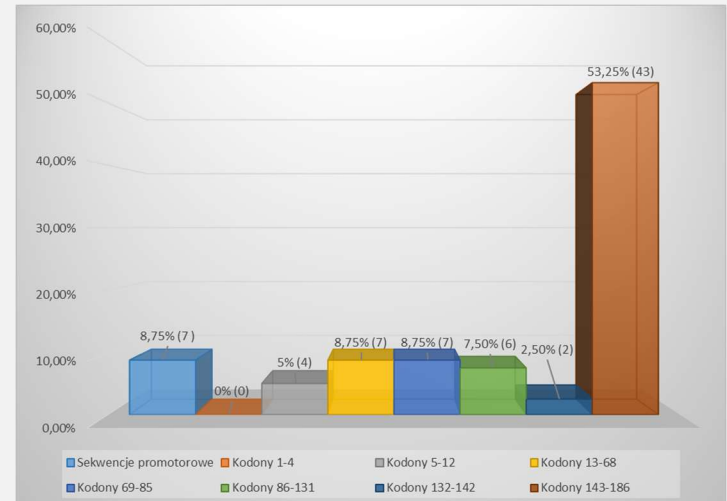


Wykres 1. Fenotyp oporności na leki podstawowe oraz leki dodatkowe wśród szczepów *M. tuberculosis* opornych na pirazynamid.



Wykres 2. Rozkład wartości MIC PZA w badanej populacji *M. tuberculosis*.

- W pracy zidentyfikowano również 4 szczepy (5%), u których oporność na PZA towarzyszyła oporności na ryfampicynę (RR-TB).
- U 61 szczepów (76,25%) wartość MIC PZA wynosiła > 900 µg/ml, u 4 (5%) 900 µg/ml, a u 9 szczepów (11,25%) 800 µg/ml. Wartość MIC PZA równą 400 µg/ml i 200 µg/ml stwierdzono u 3 szczepów każdą (Wykres 2).
- Mutacje w genie *pncA* wykryto u 76 (95%) z 80 badanych szczepów.
- Pośród 29 rodzajów mutacji w genie *pncA*, zidentyfikowano 23 zmiany nukleotydowe o charakterze substytucji (79,5%), w tym 22 zmiany niesynonimiczne i jedna synonimiczna, 2 mutacje w promotorze (7%), 3 delekcje (10%) oraz 1 duplikację (3,5%).



Wykres 3. Rozkład procentowy mutacji występujących na w genie *pncA* w badanej populacji 80 szczepów *M. tuberculosis*.

- Najczęściej odnotowywano mutację o charakterze delekcji 5 nukleotydów GAGGA w pozycji 430-434 genu *pncA*, którą zidentyfikowano u 26 (32,5%) szczepów.
- Najwięcej szczepów, bo aż 43 (53,25%) posiadało mutacje w regionie pomiędzy 143, a 186 kodonem genu *pncA* (Wykres 3).

## WNIOSKI

- Oporność na pirazynamid najczęściej występowała wśród szczepów *M. tuberculosis* fenotypie MDR-TB (40%) i pre-XDR (39%), co wskazuje na konieczność włączenia PZA do podstawowego antybiogramu dla chorych z gruźlicą wielolekooporną.
- Szczepy TB w większości przypadków (81,25%) charakteryzowały się wysokim poziomem oporności na PZA z MIC  $\geq 900$  µg/ml, a stwierdzonym u nich molekularnym mechanizmem oporności na ten lek w 93% były mutacje w genie *pncA*.
- Nie wykazano korelacji pomiędzy regionem genu *pncA*, w którym odnotowywane były mutacje, a poziomem oporności na pirazynamid.