

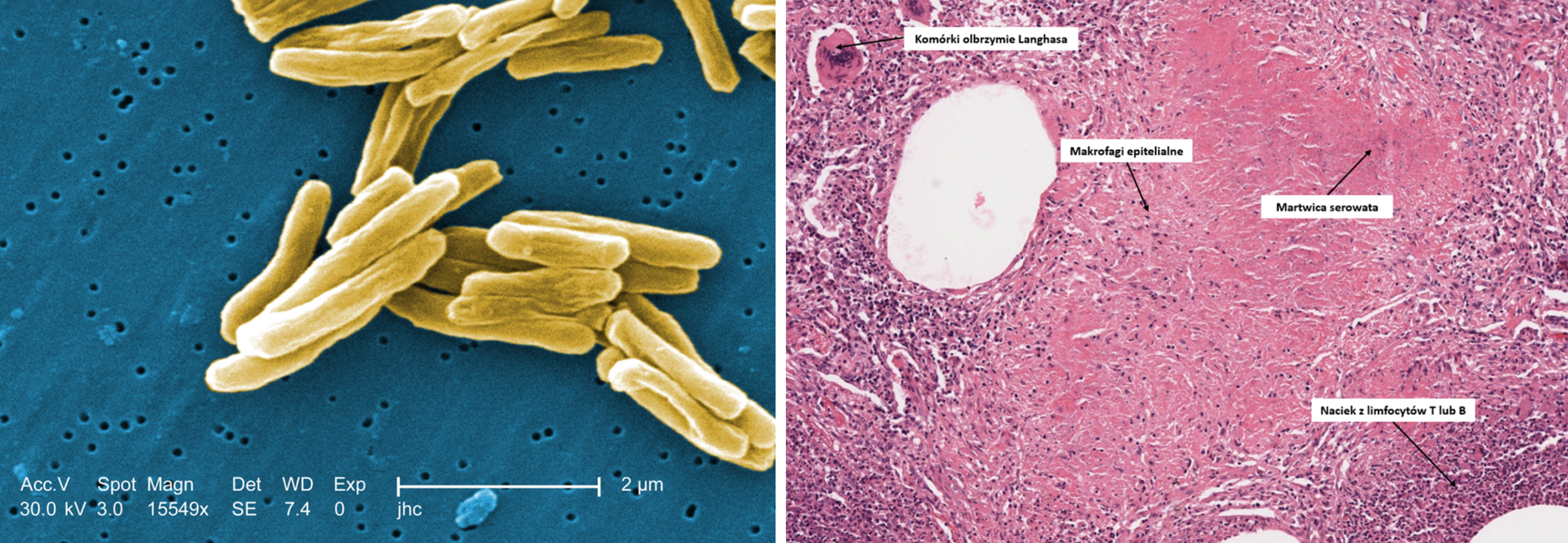
Ocena zróżnicowania genetycznego szczepów klinicznych *Mycobacterium tuberculosis*, przy użyciu typowania genetycznego metodą MIRU-VNTR

Jan Komarow¹, Agata Bluszcz¹, Mateusz Marczak¹, Zofia Bakula¹, Małgorzata Proboszcz², Rafał Krenke², Justyna Kościuch², Edita Vasiliauskienė^{3,4,5}, Laima Vasiliauskaitė^{3,4,5}, Daiva Bakonytė³, Petras Stakėnas³, Tomasz Jagielski^{1*}

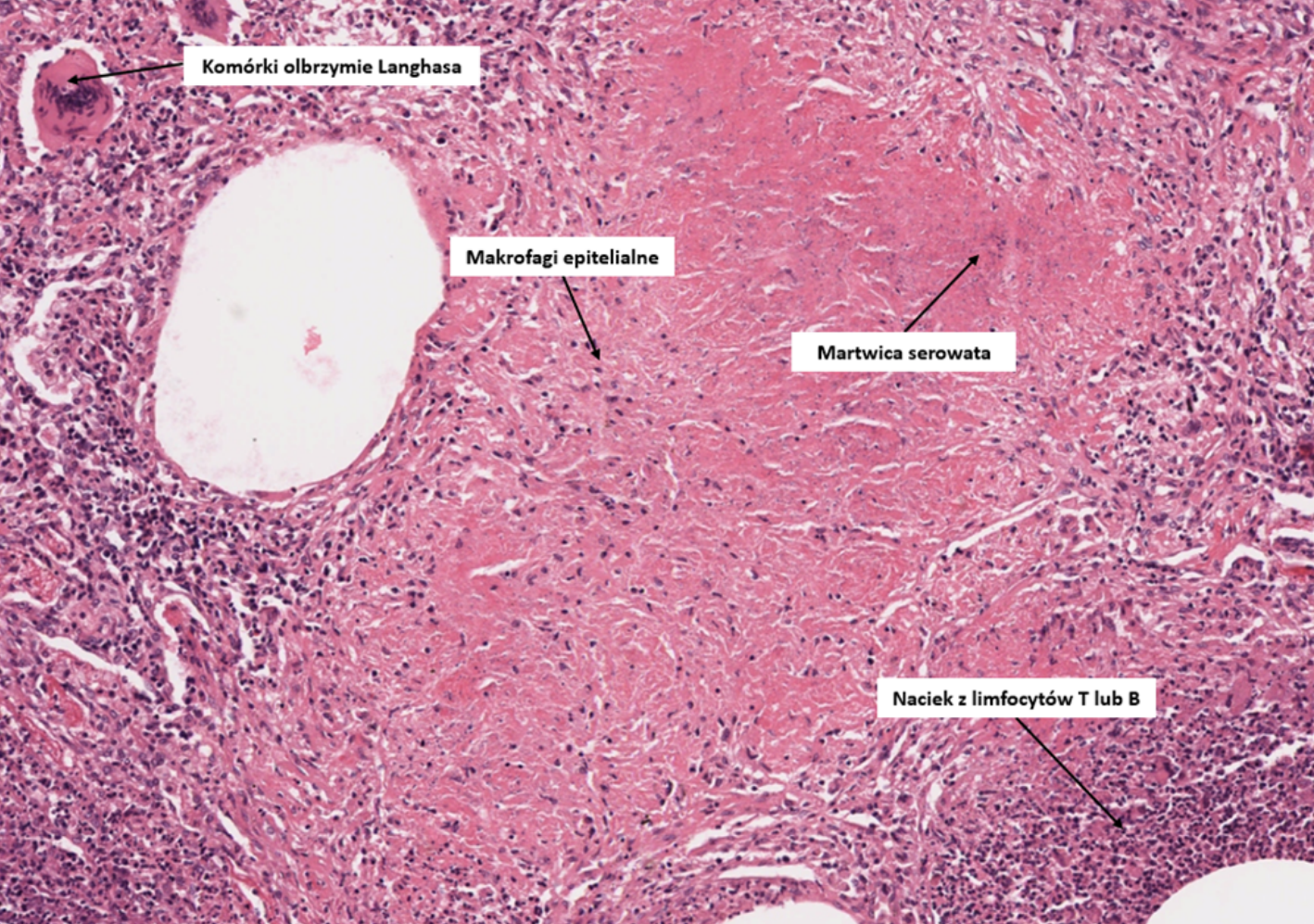
1. Zakład Mikrobiologii Medycznej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
2. Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
3. Zakład Immunologii i Biologii Komórki, Instytut Biotechnologii, Centrum Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wileński, Wilno, Litwa
4. Zakład Fizjologii, Biochemii, Mikrobiologii i Medycyny Laboratoryjnej, Instytut Nauk Biomedycznych, Uniwersytet Wileński, Wilno, Litwa
5. Centrum Medycyny Laboratoryjnej, Laboratorium Gruźlicy, Wileński Szpital Uniwersytecki Santaros klinikos, Wilno, Litwa
*e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

WSTĘP

W 2020 r. zaobserwowano wzrost liczby zgonów z powodu gruźlicy, w stosunku do poprzedniego roku, o 7,5% (1 514 000 vs 1 409 000). Według szacunków WHO, choroba ta stanowi 13. najczęstszą przyczynę zgonów na świecie. Zajmuje też 2. miejsce, zaraz po COVID-19, jako najczęstsza przyczyna zgonów wywołanych przez pojedynczy czynnik zakaźny. Celem badania była ocena zróżnicowania genetycznego szczepów *Mycobacterium tuberculosis* (Ryc. 1.), przy użyciu metody MIRU-VNTR typing.



Ryc. 1. Obraz *M. tuberculosis* w mikroskopii skaningowej. Zdjęcie pochodzi ze strony Public Health Image Library (PHIL) oraz zostało wykonane przez Janice Haney Carr. (phil.cdc.gov)



Ryc. 2. Obraz ziarniniaka gruźliczego w obrębie fragmentu tkanki płuc w przebiegu gruźlicy. Zdjęcie pochodzi ze strony Virtual Pathology at the University of Leeds. (www.virtualpathology.leeds.ac.uk)

MATERIAŁY

Do badania włączono 89 szczepów *M. tuberculosis*: 49 lekowrażliwych oraz 39 o oporności typu MDR (*multidrug-resistant*), pozyskanych od pacjentów chorych na gruźlicę płuc w Polsce, w latach 2017-2021. Próbkę pochodziły z laboratoriów diagnostycznych znajdujących się na terenie Otwocka, Krakowa oraz Warszawy. Do badań użyto też szczepu referencyjnego *M. tuberculosis* H37Rv.

METODY

Genotypowaniu zostały poddane 4 loci hiperzmienne (HVL) tj. 1982, 3232, 3820 i 4120. Mieszaniny reakcyjne zostały przygotowywane na podstawie protokołu dostępnego online (www.miru-vntrplus.org), modyfikowanego w razie potrzeby. Wartości indeksu różnicującego Huntera i Gastona (ang. *Hunter and Gaston discriminatory index*, HGDI) dla badanych loci oraz poziom transmisji gruźlicy (ang. *the recent transmission index*, RTI) obliczono wg dostępnych danych literaturowych [DOI: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.; 10.1016/j.meegid.2004.06.001]. Analiza 24 loci została przeprowadzona na podstawie danych uzyskanych w Zakładzie Mikrobiologii Medycznej.

WYNIKI

LOCI HVL

Minimalną i maksymalną liczbę powtórzeń odnotowano dla locus 3232, odpowiednio 0 oraz 27. Locus 3232 charakteryzowało się także największą liczbą alleli (n = 20), jak również największą siłą różnicującą (HGDI = 0,9323). Najmniejszą liczbę alleli (n = 9) wykazano dla locus 1982, a najmniejszą siłę różnicującą (HGDI = 0,8327) dla locus 3820. Wartości modalne (dominanty) liczby powtórzeń badanych loci oscylowały w przedziale od 3 (locus 3820) do 6 (loci 3232 i 4120) (Tab. 1).

Tab. 1. Różnorodność alleliczna badanych loci oraz ich wartość HGDI, uzyskana dla 89 badanych szczepów *M. tuberculosis*. Kolorem zielonym oznaczono liczbę szczepów z dominantą liczby powtórzeń.

Locus	Liczba poszczególnych izolatów o danej liczbie powtórzeń w locus																											HGDI
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
1982			14		3	24	6	10	9	11	9	3															0,8537	
3232	3		7	3	2	6	13	9	1	2	1		4	6	2	2	4	10	7	3	3	1					0,9323	
3820		2		24	5	24	2	2	2	2	2	10	2	2	1	4	5										0,8352	
4120		2	19	12	16	9	20			2	8	2															0,8396	

RÓŻNORODNOŚĆ GENETYCZNA BADANYCH SZCZEPÓW

W analizie MIRU-VNTR HVL uzyskano 71 pojedynczych wzorów genetycznych (dla 71 z 88 szczepów; 80,7%), oraz 5 wzorów klastrowych (dla 17 z 88 szczepów; 19,31%) (2-6 szczepów/klastery) tj. grupy, do których należy więcej niż jeden szczep z identycznym wzorem (Tab. 2). Analiza MIRU-VNTR dla 24 loci pozwoliła wyróżnić 77 wzorów unikatowych oraz 4 wzory klastrowe (2-9 szczepów/klastery) (Tab. 2). Połączenie metod MIRU VNTR 24 loci + HVL skutkowało uzyskaniem unikalnego wzoru dla wszystkich badanych szczepów *M. tuberculosis*.

Tab. 2. Różnorodność genetyczna 89 badanych szczepów *M. tuberculosis*, uzyskana w analizach MIRU-VNTR 24, HVL oraz 24 + HVL.

	Analiza MIRU-VNTR:		
	HVL	24	24 + HVL
Liczba pojedynczych wzorów	76	80	88
Liczba klastrow	5	4	0
Liczba szczepów w klastrach	17	15	0
HGDI	0,9926	0,9900	1

POZIOM TRANSMISJI GRUŻLICY

Poziom transmisji gruźlicy oszacowany wg analiz MIRU-VNTR (i) HVL, (ii) 24 wyniósł odpowiednio (i) 13,48%, (ii) 12,36% (Tab. 3). Analiza łączona MIRU-VNTR 24 loci + HVL nie wykazała transmisji w obrębie badanych szczepów. Szczepy wielolekooporne wykazywały się wyższą wartością RTI, w analizach MIRU-VNTR HVL i 24, niż szczepy lekowrażliwe. Analizy łączone nie wykazały transmisji w obrębie szczepów wielolekoopornych (Tab. 3).

Tab. 3. Poziom transmisji gruźlicy oszacowany na podstawie analiz MIRU-VNTR 24, HVL oraz analizy łączonej, dla całej badanej próby, szczepów lekowrażliwych (S) i wielolekoopornych (MDR).

	RTI dla analizy MIRU-VNTR:		
	HVL	24	24 + HVL
Cała próba n = 89	13,48%	12,36%	0,00%
MDR n = 39	10,26%	28,21%	0,00%
S n = 49	4,00%	2,00%	0,00%

WNIOSKI

- Spośród analizowanych HVL, największą zmiennością charakteryzowało się locus 3232.
- Włączenie do analizy MIRU-VNTR 24 dodatkowych 4 loci HVL zwiększyło rozdzielczość tej metody.
- Transmisji gruźlicy nie obserwowano, gdy zastosowano analizę VNTR 24+HVL. Uzyskane wyniki wskazują więc na duży wpływ zastosowanej metody oraz rygorystyczności analizy kryteriów na ocenę transmisji gruźlicy.

