

Analiza kwasów mikołowych techniką HPLC w ocenie lekowrażliwości *Mycobacterium tuberculosis**

The mycolic acids analysis with HPLC technique in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains

Renata Walkiewicz, Hanna Grubek-Jaworska, Ryszarda Chazan

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii AM w Warszawie,
Kierownik: prof. dr hab. med. R. Chazan

Summary: The aim of this study was to evaluate the utility of the quantitative analysis of mycolic acids by HPLC technique in drug susceptibility testing of the *M.tuberculosis* isolates to the first-line antituberculous drugs: isoniazid and rifampicin. Drug susceptibility of the 30 clinical M.tbc isolates was examined by the mycolic acids analysis with HPLC technique and results were compared to the proportion method on solid L-J medium and liquid medium in MGIT system. In HPLC method drug susceptibility of *M.tuberculosis* strains was described by TAMA index defined as the ratio of the total area under mycolic acids peaks (TAMA) from cultures with drug to the TAMA of control. At critical concentrations of drugs, TAMA indexes of resistant strains were >0.5 , and TAMA indexes of susceptible strains were <0.05 . The average error of the TAMA analysis was $\pm 9.5\%$. The quantitative analysis of mycolic acids by HPLC gives results compatible with standard proportion method and is a reliable method for determination of drug susceptibility of *M.tuberculosis*.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006, 74, 89:94

Key words: Mycolic acids, high pressure liquid chromatography HPLC, *M.tuberculosis*, drug resistance

WSTĘP

Gruźlica jest chorobą zakaźną, na którą rocznie umiera na świecie ok. 3 mln ludzi. Obecnie coraz większym problemem jest wzrost liczby chorych zakażonych szczepami *M. tuberculosis* opornymi na stosowane leki [1] – szczególnie groźne są szczepy wielolekooporne, definiowane jako odporne przynajmniej na izoniazyd (INH) i ryfampicynę (RMP). Rozwój szybkich metod wykrywania szczepów opornych może pomóc w ograniczaniu rozprzestrzenienia się zakażenia prątkami gruźlicy. Pewne nadzieje w tym zakresie budzą szybkie testy molekularne, ale wiedza o genotypowych uwarunkowaniach lekooporności nie jest dotychczas pełna, dlatego, pomimo wielu prac, w których podejmuje się określanie lekooporności prątków szybkimi technikami molekularnym [5], nadal niezastąpione pozostają metody fenotypowe i one są polecane dla rutynowej pracy diagnostycznej [2]. Jedną z propozycji metodycznych w zakresie nowoczesnych i zbiektywizowanych fenotypowych metod badania lekowrażliwości prątków jest wykorzystanie techniki wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Miarą lekowrażliwości szczepu z zastosowaniem tej techniki jest porównanie ob-

szaru pod pikami w elucyjnych wzorach HPLC kwasów mikołowych uzyskanych z hodowli prowadzonej w obecności leku do odpowiadającego obszaru z hodowli kontrolnej. W piśmiennictwie światowym problem podejmowano dotychczas jedynie w dwóch pracach doświadczalnych [6,12] nie odnosząc wyników do ogólnie przyjętych, zalecanych metod standardowych.

Celem obecnej pracy była ocena możliwości zastosowania ilościowej analizy kwasów mikołowych techniką HPLC w określaniu lekowrażliwości szczepów *M. tuberculosis* w odniesieniu do dwóch głównych leków przeciwprątkowych: izoniazidu i rifampicyny oraz porównanie uzyskanych wyników z lekowrażliwością tych szczepów badaną metodami standardowymi.

Materiał i metody

Szczepy *M. tuberculosis*. Badano 30 szczepów *M.tuberculosis* uzyskanych z materiałów klinicznych pochodzących od chorych z Centralnego Szpitala Klinicznego AM w Warszawie (20 szczepów) i z Mazowieckiego Centrum Leczenia Chorób Płuc i Gruźlicy (10 szczepów). Próbki kliniczne poddawano standardowej procedurze upłynniania i dekontaminacji. Hodowle prowadzono na stałej pożywce Löwensteina-Jensena (L-J) (Becton, Dickinson & Co., USA). Gatunek izolatów

* Pracę wykonano w ramach realizacji projektu badawczego 2P05D00128 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji.

identyfikowano stosując analizę kwasów mikołowych techniką HPLC [4].

Testy lekowrażliwości. W ocenie przydatności techniki HPLC w analizie lekowrażliwości, metodą odniesienia była metoda proporcji, stosowana w Polsce i uznawana jako standardowa w piśmiennictwie światowym, wykonywana na stałej pożywce Löwensteina-Jensena oraz na płynnej pożywce w systemie MGIT.

Badanie lekowrażliwości metodą proporcji na pożywce stałej Löwensteina-Jensena. Stosowano pożywkę z Centralnej Pożywkarni w Warszawie. Krytyczne stężenia leków (ZF „Polfa”) wynosiły: INH 0,2 µg/ml, RMP 40,0 µg/ml. W celu kontroli każdej serii pożywki nastawiano hodowlę szczepu wzorcowego H37Rv o znanej wartości MIC (minimal inhibitory concentration, najniższe stężenie hamujące wzrost). Wynik testu odczytywano porównując obfitość wzrostu na probówkach z lekami ze wzrostem na probówkach kontrolnych [8].

Badanie lekowrażliwości w systemie MGIT AST SIRE. Wzrost prątków wykrywany jest w tym systemie na podstawie pomiaru zużycia tlenu w płynnej pożywce hodowlanej, co powoduje fluorescencję detektora przy naświetlaniu światłem UV, $\lambda=365\text{nm}$. Do oceny promieniowania fluorescencyjnego stosowano aparat BACTECMicro MGITTM. Badanie wykonywano stosując zalecane krytyczne stężenia leków: INH 0,1 µg/ml, RMP 1,0 µg/ml. Wyniki testu, mające charakter jakościowy, interpretowano zgodnie z instrukcją producenta [10]. Czas niezbędny do wykonania testu z wyhodowanego szczepu nie przekraczał zazwyczaj 5-7 dni.

Badanie lekowrażliwości metodą analizy kwasów mikołowych techniką HPLC. Hodowle prowadzono na wzbogaconej pożywce płynnej 7H9. W badaniu stosowano trzy stężenia leków: dla INH – 0,2; 0,1; 0,05 µg/ml, a dla RMP – 2,0; 1,0; 0,50

µg/ml. Dla każdego badanego szczepu zakładano po 6 hodowli w probówkach zawierających po 4,5 ml pożywek z lekami i 0,5 ml inokulum oraz 1 hodowlę kontrolną bez leku. Próby inkubowano przez 5 dni w temp.+37°C. W każdym przypadku gęstość inokulum wynosiła <0,5 wg skali McFarlanda; warunek ten był rygorystycznie przestrzegany. Po 120 godz. inkubacji hodowlę wirowano 15 minut, 4200g, +4°C. Procedura analityczna osadu prątkowego po dekantacji płynu różniła się od postępowania w analizie jakościowej opisanej uprzednio [4]. Zmiany obejmowały: estryfikację kwasów mikołowych zawartych w 1 ml ilościowo pobranej fazy chloroformowej, ekstrakcję p-bromofenacylowych estrów do 1 ml chloroformu, pobranie 0,8 ml chloroformowego roztworu estrów i odparowanie do suchej masy, rozpuszczenie suchej masy w 40 µl dichlorometanu zawierającego standardy wewnętrzne kwasów mikołowych i natychmiastowy rozdział na kolumnie chromatograficznej. Proces chromatografii przebiegał identycznie z analizą jakościową. Dla każdego rozdziału krzywą całkowitą komputerowo wg zadanych parametrów obliczając całkowitą powierzchnię pod pikami kwasów mikołowych – TAMA (*total area under mycolic acids peaks*) charakterystycznych dla *M.tuberculosis*, co przedstawiono na ryc. 1.

Pole wyrażone jest w umownych jednostkach powierzchni wynikających z mnożenia jednostek czasu (min.) odłożonych na osi odciętych przez jednostki absorpcji na osi rzędnych. Najmniejsza wartość TAMA odczywalna w dostępnym układzie pomiarowym wynosiła 0,010. Odchylenie standardowe (SD) wartości TAMA oznaczonych dla 25-ciu pięciodniowych hodowli *M.tuberculosis* w pożywce bez leku wynosiło $\pm 9,5\%$. W oszacowaniu lekowrażliwości szczepów posłużono się wskaźnikiem „indeks TAMA” zdefiniowanym jako:

$$\text{Indeks TAMA} = \frac{\text{TAMA hodowli z lekiem}}{\text{TAMA hodowli bez leku}}$$

Rycina1. Wzór elucyjny pików kwasów mikołowych *M.tuberculosis* z zaznaczonym obszarem całkowania krzywej.
Figure 1. The *M.tuberculosis* mycolic acids pattern with integration area.

Wyniki

We wstępnym etapie doświadczeń ustalono, że logarytmiczna faza wzrostu *M. tuberculosis* mierzona wartością TAMA w wybranych warunkach hodowli (5-cio ml hodowle wzorcowego szczepu *H37Rv* na wzbogaconej pożywce 7H9, przy 0,5 ml inokulum o gęstości nieprzekraczającej wartości 0,5 wg skali McFarlanda) utrzymywała się pomiędzy 4 a 6 dniem. Następnie obliczono wartości TAMA dla

chromatograficznych rozdzielów kwasów mikolowych otrzymanych z pięciodniowych hodowli wszystkich szczepów oraz wyznaczono wartości indeksów TAMA przy różnych stężeniach leków. W celu odniesienia indeksów TAMA do metod standardowych, zbadano wzory lekooporności szczepów metodą proporcjonalną na stałej pożywce L-J oraz na płynnej pożywce w systemie MGIT. (tab. I).

W ocenie lekowrażliwości obiema metodami konwencjonalnymi 6 spośród 30 szczepów wykazy-

Tabela I. Porównanie lekowrażliwości szczepów *M. tuberculosis* ocenianej indeksem TAMA z metodami standardowymi.
Table I. Drug susceptibility of *M. tuberculosis* strains examined by the standard methods and TAMA Index.

Symbol szczepu Strain no.	Metody i stężenia krytyczne / Methods and critical concentrations							
	INH				RMP			
	L-1 0,2 µg/ml	MGIT 0,1 µg/ml	Indeks TAMA 0,1 µg/ml		L-J 40,0 µg/ml	MGIT 1,0 µg/ml	Indeks TAMA 1,0 µg/ml	
1318/01	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl
1789/02	wrażliwy	wrażliwy	0,006	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,008	wraźl
2291/02	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl
2521/02	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl
2663/02	wrażliwy	wrażliwy	0,007	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,016	wraźl
3541/02	wrażliwy	wrażliwy	0,008	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl
3621/02	wrażliwy	wrażliwy	0,022	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl
4419/03	wrażliwy	wrażliwy	0,005	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,012	wraźl
4588/03	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl
4647/03	wrażliwy	wrażliwy	0,004	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,009	wraźl
5012/03	wrażliwy	wrażliwy	0,026	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,028	wraźl
5184/03	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,007	wraźl
5592/03	wrażliwy	wrażliwy	0,007	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,017	wraźl
3298/04	Oporny	Oporny	0,914	Oporny	Oporny	Oporny	0,918	Oporny
3900/04	Oporny	Oporny	0,827	Oporny	wrażliwy	wrażliwy	0,019	wraźl
5707/04	wrażliwy	wrażliwy	0,021	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,031	wraźl
5802/04	Oporny	Oporny	0,842	Oporny	wrażliwy	wrażliwy	0,016	wraźl
5816/04	wrażliwy	wrażliwy	0,019	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,025	wraźl
5817/04	wrażliwy	wrażliwy	0,004	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,004	wraźl
5857/04	wrażliwy	wrażliwy	0,015	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,012	wraźl
5957/04	wrażliwy	wrażliwy	0,014	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,018	wraźl
6173/04	wrażliwy	wrażliwy	0,012	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,006	wraźl
6306/04	wrażliwy	wrażliwy	0,028	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,009	wraźl
6422/04	wrażliwy	wrażliwy	0,006	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,011	wraźl
6717/04	wrażliwy	wrażliwy	0,013	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,018	wraźl
7593/04	wrażliwy	wrażliwy	0,021	wraźl	wrażliwy	wrażliwy	0,014	wraźl
7670/04	Oporny	Oporny	0,930	Oporny	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl
7823/04	wrażliwy	wrażliwy	0	wraźl	Oporny	wrażliwy	0	wraźl
8026/04	Oporny	Oporny	0,726	Oporny	wrażliwy	wrażliwy	0,003	wraźl
8084/04	Oporny	Oporny	0,878	Oporny	wrażliwy	wrażliwy	0,012	wraźl

Przyjęto, że – przy krytycznym stężeniu leku – indeks TAMA>0,50 charakteryzuje szczepy odporne, a indeks TAMA<0,05 szczepy wrażliwe.

wrażliwy – sensitive oporny – resistant

L-J – metoda proporcji na podłożu Löwensteina-Jensena / propotion metod on solid Löwenstein-Jensen medium

Tabela II. Indeks TAMA przy różnych stężeniach leków – szczepy wrażliwe i odporne.
Table II. TAMA Index at different concentration of drugs – sensitive and resistant strains.

Szczepy / Strains	INH (µg/ml)			RMP (µg/ml)		
	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0
Wrażliwe / Sensitive INH n = 24 / RMP n = 29	0,017±0,013	0,010±0,009	0,006±0,007	0,017±0,014	0,010±0,009	0,006±0,007
Oporne / Resistant INH n = 6 / RMP n = 1	1,004±0,072	0,853±0,074	0,725±0,132	1,065	0,918	0,903

wało oporność na INH, 1 szczep oporność na RMP – wyniki te były zbieżne dla obu metod. Wartości indeksów TAMA spektakularnie wyróżniały szczepy wrażliwe. Przy krytycznych stężeniach leków wartości indeksów TAMA dla 24 szczepów wrażliwych na INH mieściły się w granicach 0,0–0,028 (średnio 0,010±0,009), a dla opornych w granicach 0,726–0,930 (średnio 0,725±0,132). Indeks TAMA szczepu opornego na RMP wynosił 0,918, a indeksy szczepów wrażliwych zawierały się w granicach 0,0–0,031 (średnio 0,010±0,009). Uogólniając wyniki uzyskane dla obu leków, można przyjąć, że przy krytycznym ich stężeniu indeks TAMA > 0,5 charakteryzował szczepy odporne, a indeks TAMA < 0,05 – szczepy wrażliwe. W przypadku szczepu sygnowanego 7823/04 wyniki metod konwencjonalnych nie były zgodne. Metoda proporcjonalna na pożywce stałej wskazywała na oporność na RMP, zaś w badaniu MGIT szczep okazał się wrażliwy; wartość indeksu TAMA dla tego szczepu, równa „0”, wskazywała na pełną wrażliwość szczepu w odniesieniu do RMP. W tabeli II porównano wartości indeksu TAMA uzyskane w hodowlach z różnymi stężeniami leków: krytycznym, dwukrotnie większym i dwukrotnie mniejszym. Wyniki spójnie wskazują, że wzrostowi stężenia leku towarzyszy obniżenie wartości indeksu TAMA.

Omówienie

Dotychczasowe techniki fenotypowe, powszechnie stosowane w ocenie leko-wrażliwości prątków nie są bez wad: BACTEC 460TB, w którym wzrost prątków na pożywce płynnej ocenia się techniką radioizotopową, jest uznany za uciążliwy dla środowiska i wycofywany z użycia ze względu na kosztowną utylizację odpadów, zaś minusem systemu BACTEC MGIT opartego na detekcji fluorymetrycznej, jest jedynie jakościowa (±) ocena wzrostu bakterii. Długi, co najmniej 4-tygodniowy czas oczekiwania na wynik, jest z kolei wadą powszechnie stosowanej w Polsce metody proporcji, prowadzącej się do porównania liczby kolonii wyrosniętych na pożywce stałej w obecności leku do liczby kolonii rosnących na pożywce kontrol-

nej. W ostatniej z wymienionych metod margines błędnej oceny jest szczególnie szeroki. Wynika to z technicznych trudności uzyskania standardowej dyspersji inokulum. W zawiesinach in vitro prątki tworzą zlepkę złożoną z kilku, niekiedy kilkunastu komórek, co sprawia, że w ocenie wzrostu posługujemy się określeniem CFU (colony forming unit) zakładając, że zawiesina prątków wysiewana na pożywkę z lekami ma porównywalny stopień rozproszenia mikroorganizmów. W praktyce nie zawsze tak bywa. W niniejszej pracy w przypadku szczepu 7823/04 stwierdzono niezgodność w ocenie lekowrażliwości przy stosowaniu różnych metod. Wydaje się, że w odniesieniu do tego szczepu bardziej wiarygodna jest spójna ocena metodą MGIT i analizą kwasów mikołowych z zastosowaniem techniki HPLC, bowiem nie można wykluczyć, że za odmienny wynik przy posiewie na pożywce stałej odpowiedzialna jest właśnie przypadkowa agregacja prątków [11]. Niekiedy w uzyskiwaniu homogennych zawiesin prątków stosuje się środki obniżające napięcie powierzchniowe (np. Tween 80), ale mogą one zmieniać działanie leków przez wpływ na przepuszczalność ściany komórkowej i nie są zalecane w testach lekowrażliwości [3,13].

Problem możliwości zastosowania ilościowej analizy kwasów mikołowych w testach lekowrażliwości prątków był dotychczas podejmowany jedynie w dwóch pracach doświadczalnych, które realizowała grupa badaczy z Meksyku. W 1997 roku Elwira Garza-Gonzalez i wsp. [6] wykazali zależność pomiędzy wartością TAMA a CFU w logarytmicznej fazie hodowli prątków oraz wykonali serię wstępnych doświadczeń dotyczących wrażliwości szczepu *M. tuberculosis H37Ra* na izoniazyd i streptomycynę wybraną przez nich techniką. Autorzy stosowali rozdział HPLC bromofenacylowych estrów kwasów mikołowych (podobnie do techniki stosowanej w prezentowanej pracy) i wskazywali na korzyści diagnostyczne tej techniki, przede wszystkim krótszy, w porównaniu z techniką posiewów na pożywkach, jedynie 3-4 dniowy czas oczekiwania na wynik. Na możliwość wielokrotnego zwiększenia czułości metody, a co za tym idzie perspektywę miniaturyzacji hodowli, wskazuje następna praca

uprzednio cytowanego zespołu [12], w której wykorzystano przekształcenie kwasów mikołowych w kumarynowe pochodne [9] oraz zastosowanie chromatografii wysokociśnieniowej z detektorem fluorometrycznym.

W doświadczeniach własnych podjęto próbe analizy lekooporności szczepów wyizolowanych z materiałów klinicznych i zestawienia wyników z wynikami stosowania metod konwencjonalnych. Za główne, zalety analizy kwasów mikołowych zastosowanej do oceny lekowrażliwości prątków można uznać:

- Oparcie analizy na strukturalnym elemencie ściany komórkowej prątków. Ilość kwasów mikołowych jest w logiczny sposób wprost proporcjonalna do masy prątków. Zatem w ocenie intensywności wzrostu hodowli pomija się ważną trudność techniczną związaną z oceną wzrostu na pożywkach stałych – tworzenie kolonii wywodzących się ze zlepków o nieznannej i niepoliczalnej liczbie prątków.
- Obiektywizację wyników poprzez liczbowe wyrażanie stopnia lekooporności. Jak zdefiniowano wcześniej, do wyrażenia stopnia lekooporności szczepów zastosowano wielkość względną (indeks TAMA) porównującą ilości kwasów mikołowych syntetyzowanych przez bakterie rozwijające się w obecności leków przeciwaprątkowych do hodowli kontrolnej. Zastosowanie indeksu TAMA w ocenie lekowrażliwości pozwala ujawnić ewentualne różnicowanie wśród szczepów opornych w odniesieniu do określonego leku.
- Możliwość weryfikacji gatunku prątków w przebiegu testu. Istotnym walorem stosowania techniki HPLC w testach lekowrażliwości jest stała weryfikacja gatunku badanego szczepu. W praktyce laboratoryjnej diagnostyki gruźlicy dochodzi czasami do wyhodowania innego gatunku prątków podczas kolejnych przesiewów szczepu pierwotnie pozyskanego z materiału klinicznego. Zakłada się wówczas, że w próbce klinicznej od chorego na gruźlicę (najczęściej w płwocinie) są przypadkowo obecne prątki środowiskowe. Może się wówczas zdarzyć, że wyizolowany uprzednio szczep prątków gruźlicy, przy kolejnych przesiewach, w sposób niekontrolowany zostaje zdominowany przez aktywniej namnażające się prątki środowiskowe. W przypadku, gdy pokrój i barwa kolonii rosnących na pożywce stałej są nieodróżnialne od *M.tuberculosis*, taka „zamiana” może nie zostać wykryta makroskopowo. Hodowla na pożywce płynnej

tym bardziej nie pozwala ocenić, czy mamy do czynienia z mieszaną populacją różnych gatunków *Mycobacterium* [7].

- Szybkość wykonania analizy. Badanie wyhodowanego szczepu trwa 6-7 dni. Prawidłowe wykonanie badania lekowrażliwości prątków metodą ilościowej analizy kwasów mikołowych wymaga spełnienia kilku warunków.
- Kryterium *sine qua non* jest przeprowadzenie analizy w logarytmicznej fazie wzrostu hodowli kontrolnej. W hodowli kontrolnej danego szczepu znajdującej się w fazie stacjonarnej, liczba prątków ustala się na określonym, stałym poziomie na skutek zmian w składzie pożywki takich, jak: zużycie czynników wzrostowych, spadek stężenia tlenu czy wzrost zawartości metabolitów. Jednocześnie w hodowli tego szczepu w obecności leku, prątki odporne (obecne w każdej, odpowiednio licznej populacji) znajdują się w fazie intensywnego wzrostu. Fakt ten sprawia, że zostaje zaburzony stosunek wartości TAMA hodowli z lekiem/ TAMA kontroli. Indeks TAMA może wówczas osiągać wartości zawyżone. Zatem w każdym przypadku zmian warunków hodowli (takich, jak: modyfikacja pożywki, zmiana objętości hodowli, zmiana wielkości inokulum) kinetyka wzrostu prątków powinna zostać tak zweryfikowana, aby czas hodowli, z odpowiednim marginesem błędu, nie wykraczał poza fazę logarytmiczną.
- Nieodzownym wymogiem jest także opisanie oporności poprzez wielkość względną, jaką jest indeks TAMA. Bezwzględne wyniki pomiarów TAMA przyjmują szeroki zakres wartości z uwagi na znaczące międzyszczepowe różnice w tempie podziałów bakterii. Odniesienie wartości TAMA hodowli z lekiem do wartości TAMA hodowli kontrolnej uniezależnia wyrażanie wrażliwości szczepów od tej cechy.

W niniejszej pracy ograniczono się do zbadania lekooporności jedynie 30 szczepów *M.tuberculosis* i tylko na dwa leki podstawowe, ale spójność wyników pozwala przypuszczać, że zbadanie większej liczby izolatów nie zmieniłoby wnioskowania o przydatności analizy kwasów mikołowych techniką HPLC w testach lekowrażliwości. Są także podstawy do oczekiwań, że metoda może znaleźć zastosowanie w badaniach lekowrażliwości na inne leki przeciwaprątkowe zarówno izolatów *M.tuberculosis*, jak i szczepów innych gatunków rodzaju *Mycobacterium*.

Głównym ograniczeniem zastosowania tej metody analitycznej jest konieczność dysponowania stosunkowo kosztowną i nietypową dla laboratorium mikrobiologicznego aparaturą do chromatografii wysokociśnieniowej.

Wnioski

1. Ilościowa analiza kwasów mikołowych techniką chromatografii wysokociśnieniowej jest wiarygodną metodą w oznaczaniu lekowrażliwości prątków.
2. Miarą lekowrażliwości szczepu *M.tuberculosis* badanego metodą analizy kwasów mikołowych jest ilościowe porównanie obszaru pod pikami w elucyjnych wzorach bromofenacylowych estrów kwasów mikołowych z hodowli prowadzonej w obecności leku do odpowiadającego obszaru z hodowli kontrolnej, wyrażone indeksem TAMA.

Piśmiennictwo

1. Anti-tuberculosis Drug resistance in The World, 3th Global Report. WHO/HTM/ TB/2004.343, Geneva, 2004.
2. Aziz MA i wsp.: Guidelines for Surveillance of Drug Resistance in Tuberculosis. WHO/CDS/TB/2003.320, Geneva, 2003.
3. Bosne-David S, i wsp.: Intrinsic resistance of Mycobacterium tuberculosis to clarithromycin is effectively reversed by subinhibitory concentrations of cell wall inhibitors. J Antimicrob Chemother, 2000, 46, 391-395.
4. Butler WR, i wsp.: Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. US Department of Health and Human Services 1996. <http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/TB/hplc.pdf>
5. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ.: Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev, 2001, 14, 836-871.
6. Garza-Gonzales E, i wsp.: Determination of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis through mycolic acid analysis. J Clin Microbiol 1997, 35, 1287-1289.
7. Inderlied CB, Salfinger M.: Antimycobacterial agents and susceptibility tests. W Murray PR, i wsp.: Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, 1999.
8. Janowiec M.: Mikrobiologia i serologia, PZWL, Warszawa, 1988.
9. Jost KC, i wsp.: Identification of Mycobacterium tuberculosis and M.avium complex from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. J Clin Microbiol, 1995, 33, 1270-1277.
10. MGITM AST SIRE system for the antimycobacterial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Instrukcja producenta. Becton, Dickinson & Co., USA.
11. Mitchison DA.: Drug resistance in tuberculosis. Eur Respir J, 2005, 25, 376-379.
12. Viader-Salvado JM, i wsp. Mycolic acid index susceptibility method for Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2001, 39, 2642-2645.
13. Zwolska Z: Mikrobiologia gruźlicy. W: Gruźlica w praktyce lekarskiej, red. Rowińska-Zakrzewska E., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2000.

renata@amwaw.edu.pl