

ODREĐIVANJE OTPORNOSTI VRSTE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* NA IZONIAZID MULTIPLEKS PCR METODOM

DETERMINATION OF THE RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AGAINST ISONIAZID BY MULTIPLEX PCR METHOD

Mihaela Obrovac¹, Vera Katalinić-Janković¹, Magdalena Grce²

SAŽETAK

Cilj: Ispitati mutacije u *katG* i *inhA* genima kliničkih izolata vrste *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), otpornih na isoniazid (INH).

Metode: Za to su ispitivanje izdvojena ukupno 103 klinička izolata vrste *M. tuberculosis*, prikupljena u razdoblju od 1999. do 2006. na području Hrvatske, kojima je fenotipskom metodom proporcije prema Canettiju, na Löwenstein-Jensen podlozi, utvrđena otpornost na INH. Ispitivanje mutacija u *katG* i *inhA* genima, provedeno je multipleks PCR metodom. Ta se metoda zasniva na otkrivanju mutacije AGC→ACC u *katG* genu, te *inhA*^{C-15T} mutacije u regulatornoj regiji *mabA-inhA* operona.

Rezultati: Za 76 sojeva (75%) od ukupno 103 ispitivana soja vrste *M. tuberculosis*, utvrđena je genetska osnova otpornosti na INH. Ustanovljena je povezanost između mutacije u kodonu 315 *katG* gena, te razvoja otpornosti na druge antituberkulotike.

Zaključak: Potrebno je ispitati genetske osnove otpornosti na INH, jer se *katG* mutacija pokazuje kao pretkazivač mogućega razvoja otpornosti na druge antituberkulotike.

Ključne riječi: multipleks PCR, rezistentna tuberkuloza, isoniazid, ispitivanje osjetljivosti

ABSTRACT

Aim: To detect mutations in *katG* and *inhA* genes in *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) clinical isolates resistant to isoniazid (INH).

Methods: A total of 103 isolates collected from 1999 to 2006 in Croatia and identified as INH-resistant *M. tuberculosis* strains by standard susceptibility testing proportion method according to Canetti were investigated. Multiplex PCR method was used to detect an AGC to ACC mutation in the *katG* gene and an *inhA*^{C-15T} mutation in the regulatory region of the *mabA-inhA* operon.

Results: Genetic basis of INH resistance was found for 76 (75%) of total 103 *M. tuberculosis* strains investigated. There was a correlation between mutation in 315 codon of *katG* gene and acquisition of resistance to other antituberculous drugs.

Conclusions: Mutation in *katG* gene in INH resistant *M. tuberculosis* strains is highly predictive for acquisition of resistance to other antituberculous drugs.

Key words: multiplex PCR, drug resistant tuberculosis, isoniazid, susceptibility testing

UVOD

Rezistentna tuberkuloza

Iako se u industrijski razvijenim zemljama o pojavi rezistentne tuberkuloze može govoriti već od kasnih 60-ih godina 20. stoljeća, u zadnjih je nekoliko godina u svijetu povećan broj otpornih sojeva vrste *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

¹ Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

² Institut "Ruđer Bošković", Zagreb

Primljeno: 9. 1. 2007.

Prihvaćeno: 2. 2. 2007.

Adresa za dopisivanje: Mihaela Obrovac, dipl. ing., Odjel za dijagnostiku tuberkuloze, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Rockefellerova 2, 10000 Zagreb, tel.: 01 48 63 010, e-mail: mihaela.obrovac@hzzjz.hr

Istraživanja Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) pokazala su da je rezistentna tuberkuloza prisutna na svim kontinentima, s posebnom učestalošću u pojedinim zemljama¹. Stoga je, da bi se spriječio nastanak novih slučajeva rezistentne tuberkuloze, SZO preporučio kontrolirani standardni kratkotrajni terapijski sustav za sve novootkrivene slučajeve tuberkuloze. Rezistentna tuberkuloza rezultat je ili neredovita uzimanja terapije, ili neodgovarajućih terapijskih mjera, stoga je problem za liječenje koje je dugotrajno i skupo^{2,3}.

Iako u zadnjem desetljeću incidencija tuberkuloze (TB) u Hrvatskoj ima silazni tijek, još je uvijek relativno visoka, te iznosi 26/100.000. S obzirom na to, incidencija rezistentne TB (1/100.000), te incidencija multirezistentne TB (MDR – otpornost bar na izoniazid i rifampicin, s otpornošću ili bez otpornosti na druge antituberkulotike) s 0,3/100.000 niska je, stoga ne predstavlja veći javnozdravstveni problem^{4,5,6}. Rano postavljanje dijagnoze tuberkuloze ključno je za kasnije liječenje, ali jednako tako i za prekid lanca prijenosa. Posebno se to odnosi na rano otkrivanje otpornosti na izoniazid (INH) i rifampicin (RMP), ili na otkrivanje višestruke otpornosti. Zbog otpornosti na ta dva lijeka, smanjuje se djelotvornost uobičajena terapijskoga postupka na 77%⁷. Smatralo se da je otpornost na rifampicin gotovo uvijek pretkazatelj multirezistentne tuberkuloze, ali nedavna istraživanja u više zemalja pokazala su da upravo otpornost na izoniazid često prethodi nastanku multirezistentne ili polirezistentne tuberkuloze⁸. Polirezistentni sojevi vrste *M. tuberculosis* jesu sojevi otporni na dva antituberkulotika ili više njih, ali bez kombinacije INH-a i RMP-a. U Hrvatskoj, monorezistencija na RMP izrazito je rijetka, i stjecanju otpornosti na INH i RMP prethodila je uglavnom monorezistencija na INH^{4,5,6}.

Automatizirani sustavi za kultivaciju i molekularne dijagnostičke postupke u suvremenim mikobakteriološkim laboratorijima, skratili su vrijeme otkrivanja vrste *M. tuberculosis*. Unatoč tomu, jednostavni fenotipski postupci otkrivanja otpornosti na prvu crtu antituberkulotika dugotrajni su, a genotipski postupci vezani uz komercijalne kitove nisu uvijek dostupni zbog relativno visoke cijene⁹.

Nastanak rezistentne tuberkuloze

Otpornost vrste *M. tuberculosis* na antimikobakterijske lijekove, posljedica je spontanijih mutacija u genima koji kodiraju ciljno mjesto lijeka, ili enzima

koji sudjeluje u njegovoj inaktivaciji. Poznato je da mutacije (točkaste mutacije, delecije, ili inzercije) u najmanje 11 gena dovode do otpornosti na najvažnije antituberkulotike¹⁰. Međutim, nije nađena mutacija koja bi isključivo bila odgovorna za MDR fenotip. Naprotiv, MDR se razvija postupnim i neovisnim nastajanjem mutacija na različitim lokusima. To se najčešće događa zbog neodgovarajuće terapije¹¹. Rjeđe, nastanak otpornosti posljedica je unakrsne otpornosti vezane uz kemijsku srodnost lijeka, ili sličnoga mjesta djelovanja lijeka unutar staničnoga zida¹². Budući da su višestruko otporni sojevi vrste *M. tuberculosis* rezultat kumulativnih mutacija, to znači da se rast vrste *M. tuberculosis* može kontrolirati terapijskim sustavom koji sadrži više lijekova¹³.

Uz rifampicin, izoniazid je osnovni i najučinkovitiji lijek u kratkotrajnu terapijskome postupku liječenja tuberkuloze. Ulazi u metabolički aktivnu stanicu pasivnom difuzijom kroz bakterijsku ovojnici. Najmanja inhibitorna koncentracija u osjetljivih sojeva unutar *M. tuberculosis* sklopa, varira između 0,02 i 0,05 mg/ml. Isoniazid pokazuje slabiju ili gotovo nikakvu aktivnost kada se radi o drugim članovima roda vrste *Mycobacterium*¹⁴.

Genetska osnova nastanka otpornosti

Mehanizam nastanka otpornosti na RMP relativno je jednostavan, te u 96% slučajeva uključuje mutacije u regiji *rpoB* gena približne duljine 80 baznih parova (bp), koja kodira β podjedinicu RNA polimeraze^{15,16}. Za razliku od toga, mehanizam nastanka otpornosti na INH povezan je s mnogobrojnim mutacijama koje pogađaju jedan gen ili više njih, kao što su *katG*, *inhA*, *mabA*, *ahpC*, te neke još uvijek nepoznate gene^{12,17-20,35}. Pokazalo se da delecije i mutacije *katG* gena koji kodira katalazu-peroksidazu, uzrokuju otpornost na INH. Katalaza-peroksidaza pretvara INH u aktivan oblik koji djeluje na mikobakterijske proteine (primjerice InhA) potrebne za biosintezu mikoličnih kiselina. *InhA* kodira protein-nosač enoil-acil reduktaze koji je uključen u biosintezu mikoličnih kiselina. Ustanovljeno je da su češće mutacije u regulatornoj regiji *inhA*, negoli u samome strukturnome genu *inhA*¹⁶.

Klinička važnost otpornosti i fizička obilježja vrste *M. tuberculosis*

Iako se *katG* mutacije događaju slučajno, te induciraju potpuni gubitak funkcije gena i visoku razinu otpornosti, većina mutacija otkrivenih u kliničkim izolatima posljeduje srednjom razinom

otpornosti. Najčešća otkrivena mutacija u kliničkim izolatima jest točkasta mutacija na poziciji Ser315Thr *katG* gena, ali bez dokazanih utjecaja na virulentnost i prenosivost sojeva. Sve to utjecalo je na zaključke o tomu da ta mutacija, iako klinički najvažnija, ne utječe na gubitak fizičkih sposobnosti vrste *M. tuberculosis*³⁶. Ta se pretpostavka pokazala uvjerljivom i u životinjskim modelima i u istraživanjima stvaranja molekularnih klastera. Pretpostavlja se da je u sredinama s visokom incidencijom tuberkuloze, razmjer otpornosti bolesti posljedica njena prijenosa⁷.

Slične rezultate dalo je također istraživanje kojim se pokazalo da su sojevi vrste *M. tuberculosis*, unatoč mutaciji na poziciji 315 *katG* gena, zadržali virulentnost na mišjim modelima²¹. Na tim se modelima pokazalo da je *katG* ujedno čimbenik virulencije. Smatran je i zaštitom od slobodnih radikala kisika unutar makrofaga, ali pojedinim drugim istraživanjima to nije dokazano²². Spekulira se o prisutnosti kompenzatornih mutacija koje utječu na sposobnost širenja i preživljavanja vrste *M. tuberculosis*. Upravo ta "cijena" mutacija odgovornih za otpornost, odgovorna je i za rezultate liječenja u različitim okolnostima. Jedna je od njih i reaktivacija latentne infekcije. I to je istraživanje pokazalo da INH otpornost ima minimalne posljedice na virulenciju i reaktivaciju MDR tuberkuloze. Promjene u genetici domaćina, ali i mikroorganizma, vjerojatno imaju utjecaj na njihov suodnos, preživljavanje i prijenos²³.

Nedavno je predstavljena nova multipleks PCR metoda za brzo otkrivanje INH otpornih kliničkih izolata vrste *M. tuberculosis*.²⁴ Tom se metodom istodobno otkrivaju AGC→ACC mutacija u kodonu 315 *katG* gena (dolazi do zamjene amino-kiseline serin aminokiselinom treonin, Ser315Thr), te *inhA*^{C-15T} mutacija u regulatornoj regiji *mabA-inhA* operona, mutacije koje uzrokuju otpornost vrste *M. tuberculosis* na INH (slika 1.).

Otporni sojevi vrste *M. tuberculosis*

Na Odjelu za dijagnostiku tuberkuloze Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo, potvrđuju se i prikupljaju otporni sojevi vrste *M. tuberculosis* iz cijele Hrvatske. Za ovo su istraživanje izdvojeni klinički izolati vrste *M. tuberculosis* kojima je fenotipskim postupkom proporcije prema Canettiju, na Löwenstein-Jensen podlozi (tablica 1.), ustanovljena otpornost na INH. Metoda proporcije zasniva se na usporedbi rasta vrste *M. tuberculosis* na podlozi u koju je dodana kritična koncentracija antituberkulotika, te rasta na podlozi bez antituberkulotika^{9,25,26}. Soj je

otporan ako je broj kolonija na podlozi s antituberkulotikom veći od 1%-tnoga broja kolonija na podlozi bez antituberkulotika. U ovome su radu prikazani rezultati ispitivanja mutacija u *katG* i *inhA* genima tih sojeva.

METODE

Sojevi vrste *M. tuberculosis*

U ispitivanje su uvrštena ukupno 103 klinička izolata vrste *M. tuberculosis* otporna na INH, izolirana na području Hrvatske u razdoblju od 1999. do 2006. Testiranje osjetljivosti na INH (0,2 i 1,0 µg/ml) provedeno je na Löwenstein-Jensen podlozi, metodom proporcije prema Canettiju. Ukupno 20 sojeva vrste *M. tuberculosis* osjetljivih na INH prema metodi proporcije, testirano je kao negativna kontrola.

Ekstrakcija DNA vrste *M. tuberculosis*

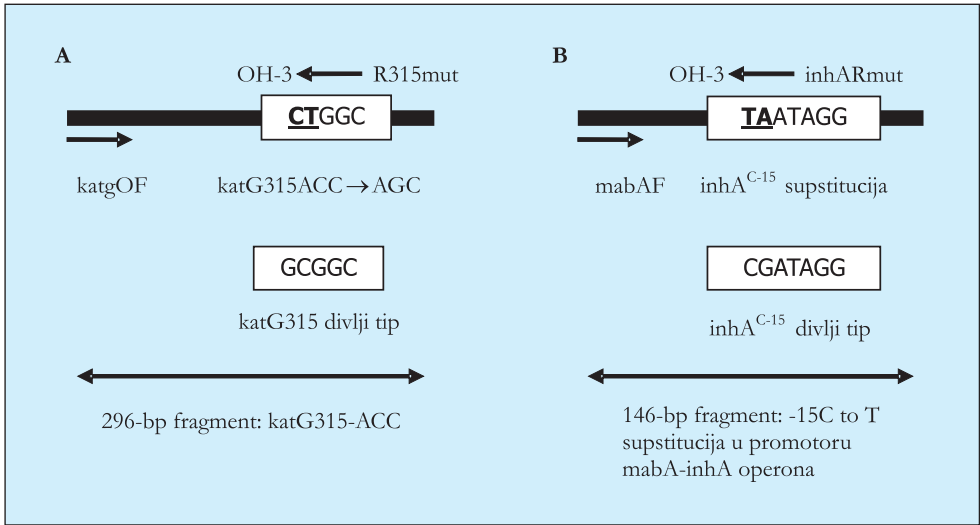
Ušica kulture mikobakterija (2 kolonije – 5 kolonija) razmućena je u 250 µl destilirane vode, te zagrijana na 98°C tijekom 20 minuta, uz miješanje u termomikseru (Thermomixer, Eppendorf). Nakon 15 minuta soniciranja u ultrazvučnoj kupelji, uzorak je centrifugiran 5 minuta na 14.000 rpm. Za multipleks PCR testiranje korišteno je 5 µl supernatanta, a ostatak je pohranjen na -20°C.

Multipleks PCR

Za otkrivanje AGC→ACC u *katG* genu i *inhA*^{C-15T} mutacija, korištene su posebno dizajnirane početnice (tablica 2.).

PCR mješavina dobivena je korištenjem HotStartTaq DNA polimeraze kita (Qiagen). Sastojala se od 10 µl PCR pufera, 5 µl otopine Q (dio spomenutoga kita), 25 mM MgCl₂, po 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, i dTTP (Roche Molecular Biochemicals), po 0,5 µl početnica *katG*OF (50 µM), R315mut (50 µM), *mabAF* (50 µM), *inhAR*mut (50 µM), MTUBf (100 µM), MTUBr (100 µM), 0,3 µl DNA polimeraze (1,6 U), te vode čistoće za molekularnu biologiju (Eppendorf) do ukupna volumena od 20 µl.

Za reakciju amplifikacije korišten je 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), s početnom denaturacijom 5 minuta na 95°C. Nakon toga slijedilo je 30 ciklusa od jedne minute na 95°C, jedne minute na 68°C, te 45 sekunda na 72°C. Nakon završnoga ciklusa, slijedila je ekstenzija od 10 minuta na 72°C. Učinkovitost PCR amplifikacija i veličine produkata bile su određene nakon elektro-



Slika 1. Shematski prikaz multipleks PCR-a za otkrivanje Ser315Thr mutacije u *katG* genu (A) i *inhA*^{C-15T} supstitucije na 5' kraju pretpostavljenoga mjesta vezanja ribosoma na promotoru *mabA-inhA* operona (B). Kratke strelice označuju početnice, a dugačke dvostrane strelice označuju fragmente dobivene umnožavanjem. Ciljne sekvencije prikazane su u kućicama. Mutirane baze podcrtane su i podebljane. (Iz: Herrera LL, i sur. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:144-7.)

Figure 1 Schematic presentation of multiplex PCR for the detection of Ser315Thr mutation in *katG* gene (A) and *inhA*^{C-15T} substitution on 5' end of the proposed location of ribosome binding on the promotor of *mabA-inhA* operon. Short arrows reveal primers and long double sided arrows indicate fragments obtained by multiplication. Target sequences are displayed in rectangles. Mutated bases are displayed with underline and bold characters (From: Herrera LL et al. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:144-7).

Tablica 1. Kritične koncentracije antituberkulotika dobivene metodom proporcije u Löwenstein-Jensen podlozi
Table 1 Critical concentrations of antituberculars in the proportion method in Löwenstein-Jensen medium

Antituberkulotik / Antitubercular	Koncentracija u Löwenstein-Jensen podlozi Concentration in Löwenstein-Jensen medium (µg/ml)	Kritična proporcija Critical proportion
Izoniazid	0,2; 1,0	1%
Rifampicin	40,0	1%
Etambutol	2,0	1%
Streptomycin	4,0	1%

Tablica 2. Početnice za multipleks PCR
Table 2 Primers for multiplex PCR

Gen / Gene	Početnica / Primer	Sekvencija početnice / Primer sequence
<i>gyrB</i>	MTUBf	TCGGACGCGTATGCGATATC
	MTUBr	ACATACAGTTTCGGACTTGCG
<i>katG</i>	<i>katg0F</i>	GCAGATGGGGCTGATCTACG
	R315mut	TCCATACGACCTCGATGCCAG
<i>mabA-inhA</i>	<i>mabAF</i>	CGAAGTGTGCTGAGTCACACCG
	<i>inhARmut</i>	AGTCACCCCGACAACCTATTA



Slika 2. Profili dobiveni multipleks PCR testom. Ljestvice 2 – 6: sojevi s *inhA*^{C-15T} supstitucijom; ljestvice 7 – 11: sojevi s AGC→ACC mutacijom u kodonu 315 *katG* gena; ljestvice 12 – 14: INH osjetljivi sojevi; ljestvice 1 i 15: DNA marker molekularne mase 100 bp (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche Molecular Biochemicals).

Figure 2 Profiles obtained by multiplex PCR. Lanes 2–6: strains with *inhA*^{C-15T} substitution; lanes 7–11: strains with AGC→ACC mutation in codon 315 of the *katG* gene; lanes 12–14: INH-susceptible strains; lanes 1 and 15: DNA marker with molecular mass of 100 bp (DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche Molecular Biochemicals).

Tablica 3. Usporedba rezultata ispitivanja osjetljivosti metodom proporcije i rezultata ispitivanja *katG* i *inhA* mutacija

Table 3 The comparison of results of susceptibility determination by the proportion method and the analysis of *katG* and *inhA* mutations

Profil otpornosti / Profile of the resistance		Tip mutacije / Type of mutation			Ukupno sojeva Total strains
		<i>katG</i>	<i>inhA</i>	Divlji tip <i>katG</i> i <i>inhA</i> * Wild type <i>katG</i> and <i>inhA</i> *	
MDR	INH, RMP	6	2	10	18
	INH, RMP, STR	20	1	2	23
	INH, RMP, EMB	6	0	4	10
	INH, RMP, STR, EMB	5	0	1	6
		37 (64,9%)	3 (5,3%)	17 (29,8%)	57
polirezistentni polyresistant	INH, STR	9	3	2	14
	INH, EMB	0	0	1	1
		9 (60%)	3 (20%)	3 (20%)	15
monorezistentni monoresistant	INH	14 (45,2%)	10 (32,6%)	7 (22,2%)	31
Ukupno / Total		60 (58,3%)	16 (15,5%)	27 (26,2%)	103

INH = izoniazid, RMP = rifampicin, STR = streptomycin, EMB = etambutol

* mutacije u ispitivanim genima nisu nađene / mutations not found in analysed genes

foreze na 2%-tnu agaroznu gelu u koji je dodan etidij bromid.

REZULTATI

Na ukupno 103 izolata vrste *M. tuberculosis* iz kliničkih uzoraka, ispitana je osjetljivost na prvu crtu antituberkulotika (INH, RMP, etambutol (EMB) i na streptomycin (STR)), metodom proporcije na krutoj Löwenstein-Jensen podlozi. Rezultati ispitivanja prikazani su u tablici 3.

Sojevi vrste *M. tuberculosis* otporni na INH, prema profilu otpornosti podijeljeni su u 3 skupine: na MDR, polirezistentne sojeve, te na monorezistentne sojeve. Među ispitivanim sojevima na INH bilo je multirezistentno 57 sojeva, 15 sojeva bilo je polirezistentno, a 31 soj bio je monorezistentan.

Ispitivanje mutacija u *katG* i *inhA* genima, provedeno je na svim sojevima kojima je fenotipskom metodom proporcije ustanovljena otpornost na INH. Ako se dogodila mutacija Ser315Thr u *katG* genu kao rezultat elektroforeze na agaroznu gelu, pojavljuje se fragment veličine 296 bp, a ako se dogodila supstitucija *inhA*^{C-15T}, pojavljuje se fragment veličine 146 bp. Svi ispitivani sojevi, uključujući osjetljive sojeve, pokazali su fragment veličine 1020 bp kao rezultat umnožavanja djelomične sekvencije *gyrB* gena. Taj je fragment pozitivna kontrola koja bi trebala biti prisutna u svakom uzorku. Nema li toga fragmenta, došlo je do inhibicije umnožavanja. Rezultati dobiveni multipleks PCR testiranjem, prikazani su u tablici 3. Od 57 multirezistentnih sojeva, 37 (64,9%) sojeva imalo je *katG* mutaciju, 3 su soja (5,3%) imala *inhA*^{C-15T} supstituciju, a 17 sojeva (29,8%) nije imalo mutacija u ispitivanim genima (divlji tip gena). Bitno je da se *katG* mutacija pojavila u 20 sojeva (87%) od ukupno 23 soja otporna na kombinaciju INH, RMP i STR, te u 5 izolata (83%) od ukupno 6 sojeva otpornih na kombinaciju INH, RMP, STR, te EMB.

Slični su rezultati dobiveni testiranjem polirezistentnih sojeva. Od 15 polirezistentnih sojeva, 9 (60%) je imalo *katG* mutaciju, 3 (20%) su soja imala *inhA*^{C-15T} supstituciju, a 3 (20%) divlji tip ispitivanih gena. Od 14 sojeva otpornih na kombinaciju INH i STR, 9 sojeva (64%) ima Ser315Thr mutaciju.

Od 31 soja s monorezistencijom na INH, 14 (45,2%) je sojeva imalo *katG* mutaciju, 10 (32,6%) *inhA*^{C-15T} supstituciju, a 7 (22,2%) divlji tip ispitivanih gena.

Sojevi osjetljivi na INH, kao i 27 (26,2%) sojeva otpornih na INH, nisu imali mutaciju u ispitivanim genima. Jednako tako, nisu pronađeni sojevi koji bi imali obje ispitivane mutacije.

RASPRAVA

Klinički važna otpornost na izoniazid, najčešće je posljedica mutacije u *katG* genu koji kodira enzim katalaza-peroksidazu, te pretvara INH u bioaktivan oblik. Dok je u različitim istraživanjima ta supstitucija zabilježena u gotovo dvjema trećinama slučajeva, mutacija u *inhA* i *ahpC* genu nađena je u manje od 10% slučajeva²⁷⁻³⁰. Ustanovljeno je da 51% sojeva vrste *M. tuberculosis* otpornih na izoniazid u južnoj Kini, ima supstituciju aminokiseline Ser315Thr^{32,33}. Dick van Soolingen i suradnici ustanovili su zamjetnu korelaciju između mutacija u kodonu 315 *katG* gena sojeva otpornih na INH, te ostale otpornosti na lijekove⁸. Vjerojatno je da će ti sojevi steći otpornost i na druge lijekove. Slični rezultati dobiveni su i u ispitivanju sojeva vrste *M. tuberculosis* koji potječu iz okolice St. Petersburga, Rusija³⁴. To se pokazalo i u rezultatima našega testiranja – gotovo dvije trećine višestruko otpornih sojeva ima Ser315Thr mutaciju. Iako se radi o relativno malom broju uzoraka, naši rezultati ukazuju na moguću povezanost te mutacije sa stjecanjem otpornosti na STR. Tako je među MDR sojevima, od 23 soja otporna na kombinaciju INH, RMP i STR, ustanovljeno da 20 sojeva ima Ser315Thr mutaciju u *katG* genu, a od 6 sojeva otpornih na kombinaciju INH, RMP, STR i EMB, 5 izolata ima istovrsnu mutaciju.

Za 2 soja (klinički izolati od dvaju bolesnika) koja su prvotno bila monorezistentna na INH, a imala su *katG* Ser315Thr mutaciju, utvrđeno je na genetskoj osnovi da su protijekom vremena razvili otpornost na RMP (neobjavljeni podaci Odjela za dijagnostiku tuberkuloze HZJZ-a), te tako postali multirezistentni. Iz ostalih laboratorijskih podataka o profilima otpornosti ispitivanih sojeva, nije moguće ustanoviti je li se radilo o prvotnoj ili stečenoj otpornosti, te kako je i da li je to utjecalo na bitniju povezanost razvoja otpornosti na STR, ili na druge antituberkulotike.

Iz naših je rezultata vidljivo da se *inhA* supstitucija dogodila mnogo češće u monorezistentnim sojevima (32,6%) negoli u polirezistentnim (20%) i MDR sojevima (5,3%).

Multipleks PCR postupak za ispitivanje mutacija u *katG* i *inhA* genima koji smo primijenili u našem testiranju brz je, pouzdan, ponovljiv i jeftin. Primje-

nom toga postupka bilo je moguće otkriti genetsku osnovu otpornosti na INH za 75% sojeva vrste *M. tuberculosis*. Ipak, za 25% slučajeva nisu ustanovljene mutacije u ispitivanim genima, stoga za te sojeve genetska osnova otpornosti nije utvrđena.

Potrebno je dalje ispitivati i pratiti razvoj otpornosti na INH na genetskoj razini, jer se Ser315Thr mutacija u *katG* genu pokazala pouzdanim pretkazivačem mogućega razvoja otpornosti na druge antituberkulotike. U našem se ispitivanju to pokazalo posebno važnim u slučaju kombinacije otpornosti na INH i STR. Uz genotipizaciju izolata vrste *M. tuberculosis* u svih novootkrivenih bolesnika na nacionalnoj razini, otkrivanjem klasetera kao nedavnih prijenosa bolesti, te praćenjem genetske osnove otpornosti, bit će moguće aktivnije provoditi protutuberkulozne mjere, te sudjelovati u kontroli bolesti.

LITERATURA

- World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Third global report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. (WHO/CDC/TB/2004.343) Geneva, World Health Organization document 2004.
- Mitchison DA. Antimicrobial Therapy of Tuberculosis: Justification for Currently Recommended Treatment Regimens. *Semin Respir Crit Care Med* 2004;25:307-15.
- Mitchison DA. Drug resistance in tuberculosis. *Eur Respir J* 2005;25:376-9.
- Katalinić-Janković V, Obrovac M, Petolas B. Bakteriološka dijagnostika tuberkuloze u 2005. godini. U: Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2005. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb 2006:216-20.
- Katalinić-Janković V, Obrovac M. Rezistentna tuberkuloza: mehanizam rezistencije i ispitivanje osjetljivosti *M. tuberculosis*. *Acta Med Croatica* 2004;58:323-8.
- Katalinić-Janković V, Obrovac M, Šimunović A. Rezultati desetogodišnjeg laboratorijskog praćenja rezistentne tuberkuloze u Hrvatskoj. *Acta Med Croatica* 2004;58:269-73.
- Cohen T, Becerra MC, Murray MB. Isoniazid Resistance and the Future of Drug-Resistant Tuberculosis. *Microb Drug Resist* 2004;10:280-5.
- van Soolingen D, de Haas PEW, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at Amino Acid Position 315 of the *katG* Gene Are Associated with High-Level Resistance to Isoniazid, Other Drug Resistance, and Successful Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. *J Infect Dis* 2000;182:1788-90.
- Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J* 2005;25:564-9.
- Nikolayevsky V, Brown T, Balabanova Y, Ruddy M, Fedorin I, Drobniewski F. Detection of Mutations Associated with Isoniazid and Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Samara Region, Russian Federation. *J Clin Microbiol* 2004;42:4498-502.
- Balcells ME, Thomas SL, Godfrey-Fausett P, Grant AD. Isoniazid Preventive Therapy and Risk for Resistant Tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 2006;12:744-51.
- Heym B, Cole ST. Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 1997;8: 61-70.
- Telenti A. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* 1998;53:793-8.
- Whitney JB, Wainberg MA. Isoniazid, The Frontline of Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *McGill J Med* 2002;6:114-23.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole ST, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;341:647-50.
- Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, Takiff HE, Cole ST. Genotypic Assessment of Isoniazid and Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a Blind Study at Reference Laboratory Level. *J Clin Microbiol* 1997;35:719-23.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole ST. The catalaseperoxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992;358:501-93.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um SK, Wilson T, Collins D, De Lisle G, Jacobs WR jr. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994;263:227-30.
- Deretic V, Philipp W, Dhandayuthapani S, Mudd MH, Curcic R, Garbe T, Heym B, Via LE, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol Microbiol* 1995;17:889-900.
- Sherman DR, Sabo PJ, Hickey MJ, Arain TM, Mahairas GG, Yuan Y, Barry CE III, Stover CK. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6625-9.
- Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* Mutations on Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the Implication for Transmission in Humans. *Infect Immun* 2002;70:4955-60.
- Manca C, Paul S, Barry III CE, Freedman VH, Kaplan G. *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun* 1999;67:74-9.
- Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Enciso A, Munoz S, i sur. Impact of bacterial genetics on

- the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog 2006;2:e61. DOI:10.1371/journal.ppat.0020061.
24. Herrera-Leon L, Molina T, Saiz P, Saez-Nieto JA, Soledad Jimenez M. New Multiplex PCR for Rapid Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:144-7.
 25. Canetti G. Present aspects of bacterial resistance in tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1965;92:687-703.
 26. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Smelev NA. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ 1969;41:21-43.
 27. Fressatti Cardoso R, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, Leite CQF, Sato DN, de Lourdes Shikama M, Mamizuka EM, Hirata RDC, Hirata MH. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brasil. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3373-81.
 28. Marttila HJ, Soini H, Huovinen P, Viljanen MK. *KatG* Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Recovered from Finnish Patients. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2187-9.
 29. Haas WH, Schilke K, Brand J, i sur. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1601-3.
 30. Elif Ozturk C, Sanic A, Kaya D, Ceyhan I. Molecular Analysis of Isoniazid, Rifampin and Streptomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients with Tuberculosis in Düzce, Turkey. Jpn J Infect Dis 2005;58:309-12.
 31. Bakonyte D, Baranauskaitė A, Civenaite J, Sosnovskaja A, Stakenas P. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Lithuania. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2009-11.
 32. Leung ETY, Ho PL, Yuen KY, Woo WL, Lam TH, Kao RY, Seto WH, Yam WC. Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a Novel Mutation in *inhA*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:1075-8.
 33. Leung ET, Kam KM, Chiu A, Ho PL, Seto W H, Yuen KY, Yam WC. Detection of *katG* Ser315Thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using PCR-RFLP. J Med Microbiol 2003;52:999-1003.
 34. Marttila HJ, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevsky BI, Otten F, Vasilyef AV, Viljanen MK. A Ser315Thr Substitution in *KatG* Is Predominant in Genetically Heterogeneous Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Originating from St. Petersburg Area in Russia. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2443-5.
 35. Guo H, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. J Med Microbiol 2006;55:1527-31.
 36. Sander P, Springer B, Prammananan T, Sturmfels A, Kappler M, Pletschette M, Böttger EC. Fitness Cost of Chromosomal Drug Resistance-Confering Mutations. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1204-11.