

CZU: 575.191:615.281:616-002.5

DOI: <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2023.3-77.11>

## PROFILUL MUTAȚIILOR GENICE RESPONSABILILE DE REZISTENȚA *M. TUBERCULOSIS* CĂTRE PREPARATELE ANTITUBERCULOASE

Nelly CIOBANU, cercetător științific

IMSP Institutul de Ftiziopneumologie “Chiril Draganiuc”,  
Chișinău, Republica Moldova

e-mail: [nelly.ciobanu28@gmail.com](mailto:nelly.ciobanu28@gmail.com)

### Rezumat.

Implementarea testelor rapide de diagnostic și testare a sensibilității către medicamente necesită o abordare complexă a acestor metode. A fost studiat paternul mutațiilor genice responsabile de rezistență la preparatele antituberculoase de linia I la pacienții cu tuberculoză rezistentă aflați la tratament în staționarul Institutului de Ftiziopneumologie. Rezultatele obținute au fost comparate cu datele similare din studiile precedente. Sa determinat că în ultimii 5 ani rezistența către RIF este determinată predominant de mutația rpoB S531L (82.9%), pentru rezistența la INH este responsabilă mutația katG S315T1 (94.6%).

**Cuvinte cheie:** mycobacterium tuberculosis, tuberculoza cu rezistență multiplă; tuberculoza cu rezistență extinsă la medicamente; testarea sensibilității către medicamente, metode molecular genetice.

### Summary. Profile of gene mutations responsible for *M. tuberculosis* resistance to antituberculosis drugs.

The implementation of rapid diagnostic tests and drug susceptibility testing requires a complex approach to these methods. The pattern of gene mutations responsible for resistance to first-line antituberculosis drugs was studied in patients with resistant tuberculosis undergoing treatment in the inpatient department of the Phthisiopneumology Institute. The obtained results were compared with similar data from previous studies. It was determined that in the last 5 years the resistance to RIF is predominantly determined by the rpoB S531L mutation (82.9%), for the resistance to INH the katG S315T1 mutation (94.6%) is responsible.

**Keywords:** mycobacterium tuberculosis, multidrug-resistant tuberculosis; tuberculosis with extensive drug resistance; drug sensitivity testing, molecular methods

### Резюме. Профиль мутаций генов, ответственных за устойчивость *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам.

Осуществление экспресс-диагностики и тестирования лекарственной чувствительности требует комплексного подхода к этим методам. Изучена картина мутаций генов, ответственных за резистентность к противотуберкулезным препаратам первого ряда, у больных резистентным туберкулезом, находящихся на лечении в стационаре Фтизиопульмонологии. Полученные результаты сравнивались с аналогичными данными предыдущих исследований. Установлено, что в последние 5 лет устойчивость к РИФ определяется преимущественно мутацией rpoB S531L (82,9%), за устойчивость к INH отвечает мутация katG S315T1 (94,6%).

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью; туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью; тестирование на чувствительность к лекарственным средствам, молекулярные методы.

### Introducere.

Depistarea precoce a TB MDR permite de a efectua la timp trierea pacienților și fortificarea activităților de control al infecției atât la nivel de staționar, cât și șa nivel de societate. Fortificarea măsurilor de control al infecțiilor sunt cruciale pentru limitarea răspândirii continue a tuberculozei rezistente în spitale și în societate (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Creșterea numărului cazurilor de tuberculoză multirezistentă (MDR-TB) și eșecurile terapeutice în tratamentul acestor forme de TB, impune necesitatea optimizării testelor de sensibilitate a *M. tuberculosis* cu scopul corijării tratamentului și reducerii deceselor pacienților

cu aceste forme de tuberculoză. Tratamentul pacienților cu tuberculoză rezistentă la medicamente ar trebui să se bazeze pe măsuri fiabile și cantitative ale testelor de sensibilitate, care au un rol primordial pentru prevenirea amplificării în continuare a rezistenței și pentru exploatarea optimă a preparatelor disponibile (7, 8, 9).

Astfel, la etapa actuală, depistarea cazurilor TB rezistente și în special a celor cu rezistență extinsă, tot mai frecvent sunt grevate de mai multe dificultăți, influențate de variabilitatea agentului patogen. Diagnosticarea întârziată sau incorectă a cazurilor de TB rezistentă, deși sunt aplicate metode sofisticate de testare a rezistenței, poate influența negativ asupra rezultatelor tratamentului

pacienților, care în consecință va duce la transmiterea infecției tuberculoase rezistente în societate. În ultimii 15-20 ani metodele rapide de diagnostic a rezistenței la medicamentele antituberculoase au fost studiate și dezvoltate aprofundat. Au fost elaborate și implementate metode rapide noi, molecular genetice pentru testarea rezistenței către preparatele antituberculoase de linia 1 și unele preparate de linia 2 (10, 11, 12, 13, 14).

Diagnosticul rapid al rezistenței la medicamentele antituberculoase a fost studiat și dezvoltat mai aprofundat numai în ultimele 2 decenii. Au fost elaborate și implementate metode rapide noi, molecular genetice pentru testarea rezistenței către preparatele de linia 1 și unele de linia 2.

Testele rapide pot fi uneori mai puțin exacte decât cultura, crescând posibilitatea unor rezultate fals pozitive și false-negative. Ambele tipuri de erori pot fi costisitoare și dăunătoare.

### Scopul studiului.

Determinarea profilului mutațiilor genice responsabile de rezistența *M.tuberculosis* către preparatele antituberculoase linia 1 la pacienții cu tuberculoză rezistentă aflați la tratament în perioada anilor 2018-2022.

### Material și metode.

Locul desfășurării studiului: IMSP Institutul Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Laboratorul Microbiologia și Morfologia tuberculozei.

### Colectare material

Pe parcursul prezentului studiu, au fost colectate probe de spută de la pacienții cu TB pulmonară, Cazuri noi și Re-tratamente aflați la tratament în staționarul Clinicii nr.1 a Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”. Tulpinile izolate de *M.tuberculosis* au fost studiate prin metodele microbiologice descrise mai jos.

### Criterii de includere

Pentru participare în studiu au fost selectați următorii pacienți: vârsta  $\geq 18$  ani; caz RIF rezistent în baza rezultatului Xpert MTB/RIF.

### Criteriu de excludere

Subiecții au fost excluși din studiu dacă nu au fost în stare să producă minimum 5 ml de spută la momentul înrolării în studiu.

### Subiectul de cercetare

Pacienți cu tuberculoză pulmonară cu rezultatele testului la sensibilitate, la care se confirmă tuberculoză multirezistentă sau tuberculoză cu rezistență extinsă și care au fost incluși în tratament.

### Metodele de cercetare

#### Microbiologice

Au fost utilizate metode microbiologice clasice:

- medii de cultură solide (LJ) pentru izolarea și testarea sensibilității *M.tuberculosis complex*, precum și metode rapide pe

- medii de cultură lichide (BACTEC MGIT960) pentru izolarea și testarea sensibilității la medicamente (TSM) a *M.tuberculosis complex*

#### Metode moleculare

- GenoType MTBDR<sup>plus</sup> ver 2.0,
- GeneXpert MTB/RIF

Următoarele gene și mutații care conferă rezistență către medicamente au fost studiate:

Tabelul 1.

#### Gene și mutații cunoscute responsabile de rezistență către INH și RIF

	Isoniazid	Rifampicin
	Gena <i>katG</i>	Gena <i>rpoB</i>
Rezistență înaltă	MUT1 S315T1	MUT3 S531L (S450L) MUT2A H526Y (H445Y) MUT2B H526D (H445D)
	MUT2 S315T2	
Rezistență joasă	<i>inhA</i> promoter MUT1 c-15t MUT2 a-16g MUT3 t-8c MUT4 t-8a	MUT1 D516V (D435V)

**Rezultate.** Au fost incluși în studiu 1258 pacienți cu rezistență la preparatele antituberculoase linia 1, dintre care 80% (n=1006) au demonstrat rezistență la ambele preparate (INH&RIF), 17.8% (n=224) au demonstrat rezistență doar la INH și 2.2% (n=28) au fost rezistenți doar la RIF.

Pentru studierea profilului de gene mutante responsabile de rezistență, tulpinile izolate prin metode culturale au fost testate prin metoda moleculară GenoType MTBDR<sup>plus</sup>. Toate investigațiile au fost realizate în Laboratorul Național de Referință pe parcursul anilor 2018 – 2022.

Rezultatele obținute sunt demonstrate în tabelul 2.

Tabelul 2.

#### Rezultatele testării tulpinilor *M.tuberculosis* rezistente la Rifampicină.

Gene & Mutații responsabile de RIF REZ	TB Caz Nou-722		Re-tratament-312		Total-1034	
<i>rpoB</i> MUT1	8	1.1	4	1.3	12	1.2
<i>rpoB</i> MUT2A	2	0.3	3	1	5	0.5
<i>rpoB</i> MUT2B	4	0.6	4	1.3	8	0.8
<i>rpoB</i> MUT3	597	82.7	260	83.3	857	82.9
<i>rpoB</i> WT+Mutații	31	4.3	11	3.5	42	4.1
<i>rpoB</i> WT absentă	80	11.1	30	9.6	110	10.6

Cea mai frecventă mutație care a fost responsabilă de rezistența a 857 tulpini de *M.tuberculosis* a fost mutația *rpoB* cu codonul S531L TCG-TGG, și a constituit 82.9%. Această mutație este responsabilă de rezistența de nivel înalt. Nu sa constatat o dife-

rență statistică între mutațiile depistate la izolatele de la pacienții cu TB cazuri noi și cei cu re-tratamente ( $p > 0.05$ ). Doar în 2.5% cazuri ( $n=25$ ) rezistența la Rifampicină a fost provocată de alte mutații (H526Y, H526D). În 4.1% ( $n=42$ ) au fost depistate atât mutațiile responsabile de rezistență față de RIF, dar și genele sălbatice corespunzătoare, fenomen care poate indica la o posibilă tulpină mixtă. La 11.1% ( $n=80$ ) pacienți cu TB cazuri noi și 9.6% ( $n=30$ ) pacienți cu TB re-tratamente nu au fost depistate mutații responsabile de rezistență la RIF, dar s-a constatat lipsa genei corespunzătoare, în baza cărui fapt s-a stabilit rezistența dedusă.

Rezultatele testării tulpinilor *M.tuberculosis* rezistente la Isoniazidă

Tabelul 3.

### Rezultatele testării tulpinilor *M.tuberculosis* rezistente la Isoniazidă

Gene & Mutații responsabile de rezistența la INH	TB Caz Nou + Re-tratament (1230)	%
H inhA WT+ H inhA MUT1	27	2.2
H katG MUT1	604	49.1
H katG MUT1, H inhA MUT1&2	559	45.4
H katG WT+Mutații	36	2.9
H katG WT abs+inhA WT abs	4	0.3

Mutațiile responsabile de rezistența joasă la INH (*inhA* promoter) au fost depistate la tulpinile *M.tuberculosis* din studiul dat doar în 2.2% ( $n=27$ ). În studiile precedente rezistența joasă precedată de prezența *inhA* promoter a fost depistată în 1.9% (15).

Mutațiile MUT1 S315T1, MUT1 S315T2 împreună cu promotorul *inhA* au fost depistate la 94.6% ( $n=1163$ ) din tulpinile *M.tuberculosis* din studiul dat. Doar MUT1 S315T1 a fost responsabilă de 49.1% ( $n=604$ ) cazuri de rezistență, și în 45.4% ( $n=559$ ) această mutație a fost prezentă împreună MUT1 S315T2 și *inhA* promoter.

În studiul dat fenomenul de rezistență cu prezența mutațiilor și concomitent prezența și a genelor sălbatice sa constatat la 2.9% ( $n=36$ ) din pacienți incluși în cercetare. Rezistența dedusă prin constatarea absenței mutațiilor cunoscute responsabile de rezistență la INH, dar și absența unor gene sălbatice a fost constatată doar în 4 cazuri (0.3%).

### Discuții.

Noi regimuri terapeutice în tratamentul tuberculozei impune crearea de noi priorități pentru testarea sensibilității către medicamente. Din cauza creșterii lente a *M.tuberculosis*, rezultatele TSM bazat pe cultură **nu sunt disponibile imediat** pentru medici pentru a fi luate în considerație la alegerea tratamen-

tului pacienților cu TB-MDR. Reducerea timpului de obținere a rezultatelor testelor este prioritară în acest domeniu. Tot odată dezvoltarea și implementarea testelor rapide de diagnostic și testare a sensibilității către medicamente necesită o abordare complexă a acestor metode.

În prezent, metodele moleculare comercial disponibile pentru testarea rezistenței medicamentoase către Rifampicină și Isoniazidă (Line Probe Assay -LPA) identifică mutații în codonii 516, 526 și 531. Există un nivel ridicat de concordanță între TSM molecular și fenotipic. Acest lucru se datorează faptului că mutațiile asociate cu rezistența la RIF sunt localizate, în special, în segmentul 81-pb al genei *rpoB*, iar mutațiile în afara regiunii sunt mai puțin frecvente.

Deși 90% din tulpinile rezistente la RMP sunt rezistente și la INH, testarea moleculară pentru INH rezistentă la medicamente este importantă. În primul rând oferă posibilitatea de a adăuga INH la un tratament cu medicamente din linia a doua, în cazurile când este absentă mutația katG315. În al doilea rând, implicările rezistenței la RMP sunt diferite, dacă sunt însoțite de rezistență la INH.

Sistemele de hibridizare pe bandă (Line Probe Assay-LPA) utilizate în prezentul studiu, detectează mutațiile în gena *inhA* pozițiile 16, 15 și 8, și katG codonul 315. Mutația katGS315T conferă o rezistență înaltă la INH (MIC 1mg/l), dar nu afectează sensibilitatea la ETH.

Datele limitate privind asocierea directă între mutația katGS315T și rezultatele clinice sugerează un risc sporit de eșec al tratamentului, decese și recidive după tratamentul unor astfel de pacienți cu preparate de linia 1. În cazul mutației katGS315T, INH *ar trebui* exclusă din schema de tratament. Comparativ cu katGS315T, promotorul mutației *inhA* conferă un nivel scăzut de rezistență la INH (MIC <1mg/l), însă afectează semnificativ sensibilitatea la Etionamidă.

Date limitate, directe și indirecte, nu sugerează nici un efect asupra ratelor de vindecare pentru tratamentul standard cu preparate de linia 1. Astfel, în cazul promotorului *mutației inhA*, ar putea fi administrată INH - de preferință în doze mari (15–20 mg/kg greutate corporală) – în combinație cu alte medicamente. În cazul promotorului mutației *inhA*, nivelul de rezistență ar trebui să fie confirmat prin metode fenotipice. Mutația *inhA* corelează cu rezistența joasă la INH, fiind un punct de relevanță clinică, deoarece bolnavii cu această mutație pot fi tratați cu doze mai mari de INH.

Cu toate acestea, clinicienii ar trebui să fie conștienți de faptul că tulpinile care posedă mutații rare sau mutații din afara segmentelor obișnuite, care nu sunt vizate de testele comerciale, ar putea să se răspândească și să devină predominante în unele cazuri.



Deși ele nu acoperă toate mutațiile implicate în rezistență la RMP, metodele moleculare pentru RMP ar putea fi considerate un standard pentru evaluarea unui diagnostic rapid la pacienții cu TB MDR. Mai mult de 95% din tulpinile rezistente la RMP au mutații în segmentul 81-pb al genei rpoB. Mutațiile S531L și H526Y/D conferă rezistență de nivel înalt la toate rifamicinele, cu dovezi puternice, directe și indirecte, de asociere cu rezistența clinică. În schimb, mutația D516T afectează predominant Rifampicina (RMP), dar mai puțin Rifabutina (RBT). Prin urmare, RBT ar putea fi considerată ca o opțiune pentru o combinație terapeutică, deși, sunt puține date clinice pentru utilizarea RBT-ului. Pentru că mutația L533 are un efect neînsemnat asupra sensibilității la toate rifamicinile, RMP și RBT sunt o opțiune pentru o combinație terapeutică în cazul unor astfel de tulpini.

Analiza sinergică a mutațiilor în genomul *M.tuberculosis*, rezultatele TS fenotipice și informațiile despre rezultatele clinice vor îmbunătăți în mod substanțial tratamentul pacienților cu TB rezistentă. Dacă ar fi colectate sistematic date calitative, iar rezultatele ar fi fost fezabile și reproductibile, creșterea numărului de dovezi despre semnificația mutațiilor specifice în genomul *M.tuberculosis* ar putea permite, în cele din urmă, diagnosticul TB rezistent prin metode moleculare, pentru a înlocui rezultatele TS bazate pe cultură.

### Concluzii

Mutațiile katG315 care conferă rezistență de nivel înalt la Isoniazidă, sau depistat la 94.6% din tulpinile *M.tuberculosis complex* evaluate. Mutații inhA promoter, responsabilă de rezistență joasă la INH sa depistat în 2.2%.

La 82.9% tulpini a fost depistate mutațiile rpoB în codonul S531L. În 4.1% au fost depistate atât mutațiile responsabile de rezistență față de RIF, dar și genele sălbatice corespunzătoare, fenomen care poate indica la o posibilă tulpină mixtă.

În 10.6% cazuri rezistența la Rifampicină a fost dedusă prin lipsa unei gene sălbatice.

Rezultatele TSM obținute prin metode moleculare ar trebui să fie urmate nu numai de abreviatu- ra „rezultate rezistente”, dar și de notarea mutațiilor identificate cu scopul de a oferi medicilor îndrumare, bazată pe cele mai bune dovezi disponibile

### Bibliografie

1. Crudu V., Merker M., Ch.Lange, E. Noroc, E. Romancenco, D. Chesov, S.Niemann. *Transmission of mycobacterium tuberculosis Ural 16315 lineage causing multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients*. ERJ. 2015.V. 46 Issue suppl 59. DOI: 10.1183/13993003.congress2015.PA2739
2. Cohen T et al. *Challenges in estimating the total burden of drug-resistant tuberculosis*. American Journal of Respiratory Critical Care and Medicine, 2008, 177(12):1302–1306.
3. Jenkins HE, Crudu V, Soltan V, Ciobanu A, Domete L, Cohen T. *High risk and rapid appearance of multi-drug resistance during tuberculosis treatment in Moldova*. Eur Respir J. 2014 Apr;43(4):1132-41.
4. Jenkins H E, Ciobanu A., Plesca V., Crudu V., Soltan V., Cohen T. Risk factors and timing of default from treatment for non-multidrug-resistant tuberculosis in Moldova. JTLD-03/2013; 17(3):373-80.
5. Jenkins H.E, Plesca V., Ciobanu A., Crudu V., Galusca I., Soltan V., Serbulenco A., Zignol M., Dadu A., Maksud Dara, Cohen T. *Assessing spatial heterogeneity of MDR-TB in a high burden country*. European Respiratory Journal 10/2012.
6. Crudu V., Matthias Merker, Lange Ch., Noroc E., Romancenco E., Chesov D., Günther Gunar, Niemann S. *Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis*. JTLD-04-15-0327
7. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis-- 5th ed. WHO/HTM/TB/2015.13
8. Sayera Banu, S. M. Mazidur Rahman et all. *Discordance across Several Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in a Single Laboratory*. Journal of Clinical Microbiology p. 156 –163 January 2014, V. 52 Number 1
9. Salman Siddiqi, Mona Javaid and Sabine Rüscher-Gerdes. *Direct Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis for Rapid Detection of Multidrug Resistance Using the Bactec MGIT 960 System: a Multicenter Study*. J. Clin. Microbiol. 2012, 50(2):435.
10. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): policy statement. Geneva, Switzerland. WHO.2008.
11. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. Summary report of the Expert Group Meeting on the Use of Liquid Culture Media. Geneva, WHO.2007.
12. Ardito F, et al.2001. *Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of M.tuberculosis*. J. Clin. Microbiol.39:4440– 4444.
13. Crudu V., Stratan E., Romancenco, E.; Moraru, N.; Turcan N.; Allerheiligen V.; Hillemann A. *First Evaluation of an Improved Assay for Molecular Genetic Detection of Tuberculosis as Well as RIF and INH Resistances*. Journal of Clinical Microbiology. 2012, v. 50, nr. 4, 1264–1269. ISSN: 0095-1137.
14. Crudu V., Stratan E.; Romancenco, E.; Moraru, N.; Turcan N.; Allerheiligen V.; Hillemann A. *The new version of molecular genetics methods for detection of tuberculosis and resistance to Rifampicin and Isoniazid*. Bull. Academy of Science of R. Moldova, 4(36) 2012, ISSN 1857-0011.
15. Ciobanu N., Alexandru S., Chesov D., Codreanu A., Lange C., Crudu V. *The correlation between levels of phenotypic resistance and genotypic mutations of M.tuberculosis*. Russian Journal of Infection and Immunity. 2018;8(4):565.