

C.Z.U.: 616-002.5-07

DOI: <https://doi.org/10.52692/1857-0011.2024.2-79.05>

DISCREPANȚE DINTRE REZULTATELE TESTĂRII SENSIBILITĂȚII *M.TUBERCULOSIS* PRIN METODE FENOTIPICE ȘI GENOTIPICE

Nelly CIOBANU, microbiolog, doctorandă

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

e-mail: nelly.ciobanu28@gmail.com

Rezumat.

Creșterea numărului cazurilor de tuberculoză rezistentă și eșecurile terapeutice în tratamentul acestor forme, impune necesitatea optimizării testelor de sensibilitate a *M.tuberculosis*. Actualmente încă nu există o metodă unanim acceptată și sigură pentru diagnosticul de laborator al TB și de cele mai multe ori se cere aplicarea mai multor metode. Cunoașterea și analiza sinergică a mutațiilor în genomul *M.tuberculosis*, evaluarea rezultatelor testelor fenotipice cu diferite nivele de rezistență, precum și informațiile despre rezultatele clinice vor îmbunătăți în mod substanțial tratamentul pacienților cu TB rezistentă. Evaluarea diferitor tipuri de rezistență genotipică, cu descrierea mutațiilor care conferă rezistență joasă sau înaltă, este în coerență nivelul de rezistență fenotipică, și de asemenea face posibilă ajustarea schemelor de tratament, care la rândul lor influențează pozitiv la durata și rezultatele tratamentului.

Cuvinte-cheie: *M.tuberculosis*, rezistența către medicamente, metode de testare a sensibilității.

Summary. Discrepancies between the results of *M.tuberculosis* susceptibility testing by phenotypic and genotypic methods

The increase in the number of cases of drug-resistant TB and the therapeutic failures in the treatment, imposes the need to optimize the sensitivity tests of *M.tuberculosis*. There is still no unanimously accepted and reliable method for the laboratory diagnosis of TB and most often the application of several methods is required. Knowledge and synergistic analysis of mutations in the *M. tuberculosis* genome, evaluation of the results of phenotypic tests with different levels of resistance, as well as information about clinical outcomes will substantially improve the treatment of patients with drug-resistant TB. Evaluation of different types of genotypic resistance, with the description of mutations that confer low or high resistance, is consistent with the level of phenotypic resistance, and also makes it possible to adjust treatment regimens, which in turn positively influence the duration and results of treatment.

Key words: *M.tuberculosis*, drug resistance, methods of sensitivity testing.

Резюме. Расхождения результатов тестирования *M.tuberculosis* фенотипическими и генотипическими методами.

Увеличение числа случаев резистентного туберкулеза и терапевтические неудачи в лечении этих форм диктуют необходимость оптимизации тестов на чувствительность *M.tuberculosis*. В настоящее время не существует общепризнанного метода лабораторной диагностики туберкулеза и в большинстве случаев требуется применение нескольких методов. Знание и синергетический анализ мутаций в геноме *M.tuberculosis*, оценка результатов фенотипических тестов с разным уровнем резистентности, а также информация о клинических результатах существенно улучшат лечение больных резистентным туберкулезом. Оценка различных типов генотипической устойчивости с описанием мутаций, обуславливающих низкую или высокую устойчивость, согласуется с уровнем фенотипической устойчивости, а также позволяет корректировать лечение, что в свою очередь положительно влияет на результаты лечения.

Ключевые слова: *M.tuberculosis*, лекарственная устойчивость, методы тестирования чувствительности.

Introducere.

În ultimele decenii metodele rapide de diagnostic și testare a rezistenței la medicamentele antituberculoase au fost studiate și dezvoltate foarte 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.

Pe măsură ce tehnologiile moleculare sunt în continuă dezvoltare, este important ca informația despre rezultatele TS moleculare, despre metodele

fenotipice cantitative de testare a rezistenței la medicamente și evoluția clinică, să se potrivească (în baze de date verificate calitativ). Acest lucru este important nu doar pentru mutații cu relevanță clinică cunoscută, ci și pentru marea majoritate a mutațiilor identificate prin secvențierea întregului genom micobacterian (WGS), fără o semnificație cunoscută încă.

Spre regret, multiplele locații ale mutațiilor pentru un medicament și faptul că rezistența la fiecare medicament în parte poate implica mutații în mai

mult de o genă sau în loci distincți ai aceleiași gene, fac ca testele moleculare de detecție a rezistenței la medicamente să devină o sarcină dificilă. De exemplu, mutațiile asociate cu rezistența la INH au fost găsite în gena catalazei micobacteriene (*katG*) și în genele care codifică enzimele ce participă la sinteza acidului micolic din peretele celular (*inhA*). Totodată, se cunoaște, că aproximativ 15-25% din izolatele rezistente la INH nu conțin mutații în aceste regiuni, ceea ce indică faptul că, în rezistența la acest medicament, sunt, implicate de asemenea și alte gene.

Rezistența la RIF este mai ușor de evaluat folosind metodele moleculare, deoarece mai mult de 96% din tulpinile *M. tuberculosis* rezistente la RIF conțin mutații într-o regiune bine definită - *81-bp* (codonul 27), regiunea centrală a genei ce codifică subunitatea beta a polimerazei ARN (*rpoB*). Totuși, unele mutații asociate cu rezistența la RIF, de asemenea, pot apărea și în alte regiuni ale *rpoB*, deși mai puțin frecvent (de ex., mutația V146F în regiunea N-terminală).

Actualmente încă nu există o metodă unanim acceptată și sigură pentru diagnosticul de laborator al TB și de cele mai multe ori se cere aplicarea mai multor metode, atât pentru detecție și confirmare, cât și pentru monitorizarea tratamentului antituberculos.

Astfel, dezvoltarea și implementarea testelor rapide de diagnostic și testare a sensibilității către medicamente necesită o abordare complexă a acestor metode. Pentru compilarea performanțelor metodelor de laborator și pentru utilizarea lor eficientă, cu generarea de informații complete și rapide pentru pacient, este foarte important ca diagnosticul de laborator să fie efectuat gradual, pornind de la metode de complexitate scăzută și continuând cu metode mai complexe și mai sigure, de la laboratoare cu facilități

mai mici spre laboratoare cu posibilități mai mari, acești pași fiind expuși într-un singur algoritm de diagnostic, acceptat și utilizat de către toți lucrătorii medicali implicați în controlul TB.

Scopul studiului. *Evaluarea discrepanțelor dintre rezultatele testării sensibilității M.tuberculosis către medicamente prin metode fenotipice și genotipice.*

Material și metode.

Testarea rezistenței fenotipice a *M.tuberculosis* a fost efectuată pe medii solide (Lowenstein-Jensen) și pe medii lichide (Middlebrook 7H9) în sistemul BACTEC MGIT-960 în combinație cu soft-ul EpiCenter echipat cu modulul TBExiST. Acest sistem oferă informații suplimentare pentru estimarea rezultatelor discrepante și luarea de decizii corecte la pacienții cu TB MDR, în special în cazurile TB XDR.

Pentru evaluarea rezistenței genotipice și spectrul de mutații responsabile de rezistența la diferite preparate au fost utilizate metode molecular genetice GenoType MTBDR*plus* & *sl*.

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

Rezultate.

Pentru estimarea ponderii diferitor mutații responsabile de rezistența *M.tuberculosis* către preparatele antibacteriene a fost studiată baza de date a rezultatelor investigațiilor molecular genetice pe parcursul anilor 2018-2019 din Laboratorul Național de Referință a Institutului de Ftiziopneumologie. Au fost analizate 4570 rezultate ale metodei molecular genetice MTBDR*plus*. Astfel, din totalul de probe testate în 37.9% cazuri (n=1734) au fost sensibile către Rifampicină, și în 62.1% cazuri (n=2836) tulpinile testate au prezentat rezistență către Rifampicină. Cea mai frecventă mutație care a fost responsabilă

Tabela 1.

Spectrul de mutații responsabile de rezistența la diferite preparate antituberculoase.

Isoniazid	Rifampicin	FQ	INJ
<i>katG</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>	<i>rrs</i>
Rezistență înaltă	Rezistență înaltă	Rezistență înaltă	1401 A-G
MUT1 S315T1	MUT 3 S531L (S450L)	gyrA MUT3C(gyrA D94G)	1462 A-T
MUT2 S315T2	MUT2AH526Y (H445Y)	gyrA MUT3D(gyrA D94H)	1484 G-T
	MUT 2B H526D (H445D)	gyrAMUT3B(gyrA D94N/Y)	1486 A-T
Rezistență joasă	Rezistență joasă	Rezistență joasă	<i>eis promoter</i>
<i>inhA</i> promoter	MUT 1 D516V (D435V)	gyrA MUT1 (gyrA A90V)	-10 G-A
MUT1 c-15t		gyrA MUT2 (gyrA S91P)	-12 C-T
MUT2 a-16g		gyrA MUT3A (gyrA D94A)	-14 C-T
MUT3 t-8c		gyrB MUT1 (gyrB N538D)	-43 A-T
MUT4 t-8a		gyrB MUT2 (gyrB E540D)	

Tabela 2.

Discrepanțele prezente în rezultatele metodelor fenotipice (MGIT 960) și moleculare (GeneXpertMTB/RIF/Ultra, GenoType MTBDRplus/sl).

BACTEC MGIT 960	Xpert Sens	Xpert Rez	Total
Cultura RIF Sens	910	22	932
Cultura RIF Rez	2	393	395
Discrepanțe Sens, %	2.4		1327
Discrepanțe Rez; %	0.5		
MTBDRplus	Xpert Sens	Xpert Rez	Total
MTBDRplus RIF Sens	366	16	382
MTBDRplus RIF Rez	3	282	285
Discrepanțe Sens, %	4.2		667
Discrepanțe Rez; %	1.1		
BACTEC MGIT 960	MTBDRplus -Sens	MTBDRplus -Rez	Total
Cultura RIF Sens	929	12	941
Cultura RIF Rez	8	730	738
Discrepanțe Sens, %	1.3		1679
Discrepanțe Rez; %	1.1		
BACTEC MGIT 960	MTBDRsl -Sens	MTBDRsl -Rez	Total
Cultura FQ Sens	770	25	795
Cultura FQ Rez	25	277	302
Discrepanțe Sens, %	3.1		1097
Discrepanțe Rez; %	8.3		

de rezistență a 2067 tulpini de *M.tuberculosis* a fost mutația rpoB cu codonul S531L TCG-TGG, si a constituit 72.9%. Această mutație este responsabilă de rezistența de nivel înalt. Doar în 3.7% cazuri (n=106) rezistența la Rifampicină a fost provocată de alte mutații și în 23.4% cazuri (n=663) nu au fost depistate mutații, dar au lipsit genele sălbatice ale ADN M.tb, și astfel au fost evaluate ca tulpini rezistente.

Sensibile către Isoniazidă au fost depistate 30.9% tulpini *M.tuberculosis* (n=1411) și 69.1% (n=3159) tulpini au prezentat rezistență. Cea mai frecventă mutație responsabilă de rezistență la Isoniazidă a fost mutația katG cu codonul 315 AGC-ACC, cu prezența sau absența mutației inhA – 87.9% tulpini (n=2777). Doar mutația inhA aparte a fost detectată în 2.6% cazuri (n=81 tulpini). Această mutație este responsabilă de rezistența de nivel jos a M.tuberculosis. Pentru 9.5% tulpini (n=301) nu au fost depistate mutații, dar au lipsit genele sălbatice ale ADN M.tuberculosis, și astfel au fost evaluate ca tulpini rezistente.

De asemenea au fost evaluate discrepanțele în rezultatele metodelor **fenotipice și genotipice**. Rezultate importante au fost obținute la evaluarea metodelor culturale fenotipice, care sunt recomandate de OMS ca “standardul de aur” în diagnosticul microbiologic al tuberculozei și metodele moleculare, care sunt pe larg implementate astăzi în practica laboratoarelor din domeniu, ca metode de rutină.

Astfel, la evaluarea a 1327 de rezultate paralele obținute prin metoda BACTEC MGIT 960 și metoda moleculară GeneXpert MTB/RIF&Ultra sau înregistrat 2.4% discrepanțe la rezultatele sensibile pentru Rifampicină (22 rezultate fenotipic sensibile au demonstrat rezistență genotipică, din 932 tulpini) și 0.5% la rezultatele rezistente pentru Rifampicină (2 rezultate din 395 tulpini rezistente).

Dintre 667 rezultate paralele obținute prin metodele genetice GeneXpert MTB/RIF, GeneXpert MTB/Ultra și GenoType MTBDRplus au fost înregistrate 4.2% rezultate discrepante la tulpinile sensibile la GenoType MTBDRplus, dar rezistente la GeneXpert MTB/RIF (16 tulpini din 382 sensibile) și 1.1% la tulpinile rezistente la GenoType MTBDRplus, dar sensibile la GeneXpert MTB/RIF (3 tulpini din 285).

La evaluarea a 1679 de rezultate paralele obținute prin metoda culturală convențională BACTEC MGIT 960 și metoda molecular genetică GenoType MTBDRplus sau înregistrat 1.3% discrepanțe la rezultatele sensibile pentru Rifampicină (12 rezultate din 941 tulpini sensibile) și 1.1% la rezultatele rezistente pentru Rifampicină (8 din 738 tulpini rezistente).

Cele mai elocvente rezultate au fost depistate la evaluarea rezultatelor paralele obținute prin metoda culturală convențională BACTEC MGIT 960 și metoda molecular genetică GenoType MTBDR_{sl}. Au fost evaluate 1097 de rezultate paralele obținute prin aceste metode. Sau înregistrat 3.1% discrepanțe la rezultatele sensibile pentru Florochinolone (25 rezultate din 795 tulpini sensibile) și 8.3% la rezultatele rezistente pentru fluorochinolone (25 rezultate din 302 tulpini rezistente).

Discuții.

Metodele moleculare revoluționează managementul pacienților cu TB rezistentă. OMS recomandă utilizarea TS moleculare, folosind Xpert pentru detectarea rezistenței la RMP la persoanele cu risc sporit de TB-MDR sau HIV asociat cu TB și utilizarea metodelor LPA comerciale pentru diagnosticarea rapidă a MDR TB.

Pentru cazurile cu discrepanțe ale rezultatelor testelor de sensibilitate fenotipice și genotipice, trebuie să fie disponibile în plus informații despre nivelul de rezistență și / sau genele și tipurile de mutații. Pentru a obține rezultate fiabile a testelor de sensibilitate, metodele fenotipice și genotipice trebuie utilizate în paralel, pentru a fi introduse treptat fără pierderea metodelor culturale existente. Metoda fenotipică este încă necesară, pentru corectarea rezultatelor moleculare ale testelor de sensibilitate, în special din specimene microscopic negative și pentru a detecta XDR-TB.

Rezultatele GeneXpert MTB/RIF&Ultra și GenoType MTBDR_{plus}&_{sl} stau la baza luării deciziilor clinice, în cazul în care aceste tehnologii sunt disponibile. Acest lucru este important mai ales pentru identificarea mutațiilor care apar în gena *rpoB*, care rezultă cu rezistență la RIF.

Pe măsură ce tehnologiile moleculare sunt în continuă dezvoltare, este important ca informația despre rezultatele TS moleculare, despre metodele fenotipice cantitative de testare a rezistenței la medicamente și evoluția clinică, să se potrivească (în baze de date verificate calitativ). Acest lucru este important nu doar pentru mutații cu relevanță clinică cunoscută, ci și pentru marea majoritate a mutațiilor identificate prin secvențiere, fără o semnificație cunoscută încă.

Concluzii.

Mutațiile katG315 care conferă rezistență de nivel înalt către Isoniazidă, sau depistat la 87.9% din tulpinile *M.tuberculosis complex* evaluate, și în 2.6% sa depistat mutația inhA (rezistență joasă).

La 72.9% tulpini a fost depistate mutațiile *rpoB* în codonul S531L și în 3.7% codonul H526D, responsabile de rezistența la Rifampicină nivel înalt.

Cel mai frecvent au fost constatate discrepanțe dintre metode fenotipice și genotipice la testarea rezistenței către fluorochinolone (3.1% printre cazurile sensibile și 8.3% printre cazurile rezistente).

Bibliografie.

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva: WHO/CDS/TB/2019 http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Sven Hoffner. *Multidrug-resistant tuberculosis: The problem and some priorities in controlling it*. Int. J. of Mycobacteriology 5 (2016) S59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.10.031>
3. V. Crudu, Matthias Merker, Christoph Lange, Ecaterina Noroc, Elena Romancenco, D. Chesov, G. Günther, A. Buga, Sofia Alexandru, S. Niemann. *Transmission of mycobacterium tuberculosis Ural 16315 lineage causing multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients*. Eur Respir J. 2015. Vol. 46 Issue suppl 59. DOI: 10.1183/13993003.congress2015.
4. 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.
5. Chitwood MH, Colijn C, Yang C, Crudu V Ciobanu, N Codreanu, A, J Kim, Isabel Rancu, Kyu Rhee, Ted Cohen & Benjamin Sobkowiak. *The recent rapid expansion of multidrug resistant Ural lineage Mycobacterium tuberculosis in Moldova*. Nature Communications (2024) 15:2962. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47282-9>
6. Benjamin Sobkowiak, Patrick Cudahy, Melanie Chitwood, Caroline Colijn, Katharine Walter, Valeriu Crudu, Ted Cohen. *A new method for detecting mixed Mycobacterium tuberculosis infection and reconstructing constituent strains provides insights into transmission*. bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2024.04.26.591283>

7. Yu Lan, Valeriu Crudu, Nelly Ciobanu, Alexandru Codreanu, Melanie Chitwood, Benjamin Sobkowiak, and Ted Cohen. *Identifying local foci of tuberculosis transmission in Moldova using a spatial multinomial logistic regression model*. eBioMedicine 2024;102: 105085 www.thelancet.com Vol 102 April, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105085>
8. Thirumurugan Ravibalan, Kathirvel Maruthai, Antony V. Samrot, and Muthuraj Muthaiah. *Characterization of katG and rpoB gene mutations in Multi Drug Resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates*. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2014) 3(9) 1072-1080 <http://www.ijcmas.com>
9. Dhruv Gandhi, Aditi Gupta, Zahabiya Nalwalla, Ira Shah. *Discordance between Xpert MTB/RIF assay and Line Probe Assay- how to interpret?* Pediatric Oncall · July 2024 DOI: 10.7199/ped.oncall.2024.39
10. Anda Vīksna, Darja Sadovska, Iveta Berge, Ineta Bogdanova, Annija Vaivode, Lauma Freimane, Inga Norvaiša, Iveta Ozere and Renāte Ranka. *Genotypic and phenotypic comparison of drug resistance profiles of clinical multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates using whole genome sequencing in Latvia*. BMC Infectious Diseases (2023) 23:638 <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08629-7>