

Diagnostic convențional și molecular la un eșantion de pacienți cu TB-DR

Roxana Mîndru¹,
Victor Spînu²,
Cristina Popa²,
Elena Botezatu³,
Ruxandra Spătaru⁴

1. Laborator Național de Referință
- Institutul de Pneumoftiziologie
„Marius Nasta” București

2. Centrul MDR - Institutul de
Pneumoftiziologie „Marius Nasta”
București

3. Centrul de Excelență MDR -
Bisericiani Neamț

4. Institutul de Pneumoftiziologie
„Marius Nasta” București

Correspondență:
Dr. Roxana Mîndru, Laborator
Național de Referință,
Institutul de Pneumoftiziologie
„Marius Nasta”, Sos. Viilor 90,
București, România
e-mail: roxanamindru@gmail.com

Abstract

Conventional and molecular diagnosis on a group of patients with TB-DR

Worldwide, although the incidence of the sensitive/susceptible tuberculosis diminished, the number of drug resistant tuberculosis is growing. The bacteriological diagnosis, genetic and phenotypic, becomes essential for the epidemic control. The resistance appears as a phenotypic expression of mutations from *M. tuberculosis* genome. The mutations that appear for Rifampicin are in region *rpoB*, for Isoniazid in region *katG* and *inhA*, for Ethambutol - *embB*, Quinolone - *gyrA*, Aminoglicozid and Cyclical Peptides - *rrs*. To follow the concordance of results of drug sensitivity test (DST) through phenotypic and genetic method, we analyzed a group of 40 patients with TB-DR. We performed drug susceptibility testing on Lowenstein-Jensen medium according to the instructions of the manufacturer. The strains were tested indirect genetic too, Genotype MTBDR plus for INH and RIF and Genotype MTBDRsl for the second line drugs. The concordance between genetic method and the phenotypic method is 95%, 5% from the patients have different sensitivity to INH and RIF, but phenotypic they are resistant, meaning that they have other mutations undetected by the strip. The most common mutation in region *rpoB* is MUT3 (52%) associating the absence of band W8. Mutations in the region *rpoB* MUT1 and MUT2A are 12.5%, and 15% respectively. For high resistance to INH, the most common is MUT1 for *katG* 95% and for low resistance to INH MUT1 from region *inhA* - 30%. For the second line drugs, the most frequent concordance between genetic method and phenotypic method is for EMB, of 30%, genetically speaking the strains display no mutation in region *embB*, but are resistant in phenotypic method. For FQ, KAN, AMK and CAP the concordance between the two methods is of 100% to all tested strains. In conclusion, genetic methods have high sensitivity, they are fast and shorten significantly the diagnosis time.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistant tuberculosis, drug susceptibility testing, line probe assay

Rezumat

Pe plan global, deși a scăzut incidența tuberculozei sensibile, crește numărul de cazuri cu tuberculoză drog-rezistentă. Diagnosticul bacteriologic rapid genetic și fenotipic devine esențial pentru controlul endemiei. Rezistența apare ca expresie fenotipică a mutațiilor din genomul *M. tuberculosis*. Mutațiile care apar sunt: pentru Rifampicină în regiunea *rpoB*, pentru Isoniazidă - în regiunea *katG* și *inhA*, pentru Etambutol - *embB*, Quinolonă - *gyrA*, Aminoglicozide și Peptide ciclice - *rrs*. Pentru a urmări concordanța rezultatelor la antibiogramă prin metoda fenotipică și genetică, s-a luat în calcul un eșantion de 40 de pacienți cu TB-DR. S-a efectuat antibiogramă fenotipică pe mediul Lowenstein-Jensen. Tulpinile au fost testate și genetic indirect, Genotype MTBDR plus pentru H, R și Genotype MTBDRsl pentru linia a doua. Concordanța dintre metoda genetică și metoda fenotipică este de 95%. Un procent de 5% dintre pacienți au diferite sensibilități la Isoniazidă și Rifampicină, dar fenotipic sunt rezistenți, ceea ce poate însemna că au alte mutații nedectate de strip. Cea mai frecventă mutație în cadrul *rpoB* este Mut 3, cu un procent de 52% și cu absența benzii W8. În cadrul *rpoB* Mut 1 și Mut 2A sunt în procent de 12,5% și respectiv 15%. Pentru rezistența înaltă la Isoniazidă, cea mai frecventă este Mut1 pentru *katG* - 95%, iar pentru rezistența scăzută la Isoniazidă, Mut 1 din domeniul *inhA* - 30%. Pentru linia a doua, cele mai multe neconcordanțe între metoda genetică și cea fenotipică sunt la Etambutol - 30%, genetic tulpinile ne reprezentând nici o mutație în domeniul *embB*, dar fenotipic fiind rezistente. Pentru Ofi, K, AMK și Cap, concordanța între cele două metode este de 100% la tulpinile testate. În concluzie, metodele genetice sunt metode cu sensibilitate și specificitate mare, rapide, care scurtează mult timpul de diagnostic.

Cuvinte-cheie: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculoza drog-rezistentă, antibiograma fenotipică, line probe assay

Introducere

Tuberculoza (TB) rămâne în continuare o problemă importantă de sănătate publică. La nivel mondial, în 2012, O.M.S. (Organizația Mondială a Sănătății) estima apariția anuală a 8,6 milioane de cazuri noi de tuberculoză și a 1,4 milioane de decese prin TB (echivalând cu 3.800 de decese pe zi)¹.

În prezent, o treime din populația globului este infectată cu *Mycobacterium tuberculosis*. În România, aproximativ 13.000 de persoane se îmbolnăvesc de TB, 1.200 decedând din cauza acestei boli. Incidența globală a TB (cazuri noi și recidive) este cea mai crescută din UE

(Uniunea Europeană) și una din cele mai mari din Regiunea Europa O.M.S. (România ocupând locul VI, după Kazahstan, Republica Moldova, Georgia, Kîrgîstan și Tadijkistan - Figura 1)¹.

Schimbările importante care au avut loc în istoria naturală a TB au un impact major în epidemiologia TB-DR (tuberculoza drog-rezistentă). Incidența în creștere a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) rezistente la cele mai eficiente medicamente anti-TB reprezintă un factor major care contribuie la evoluția epidemiei².

Rezistența *M. tb* este cauzată de mutațiile cromozomiale care codifică ținta drogurilor. Multidrog-

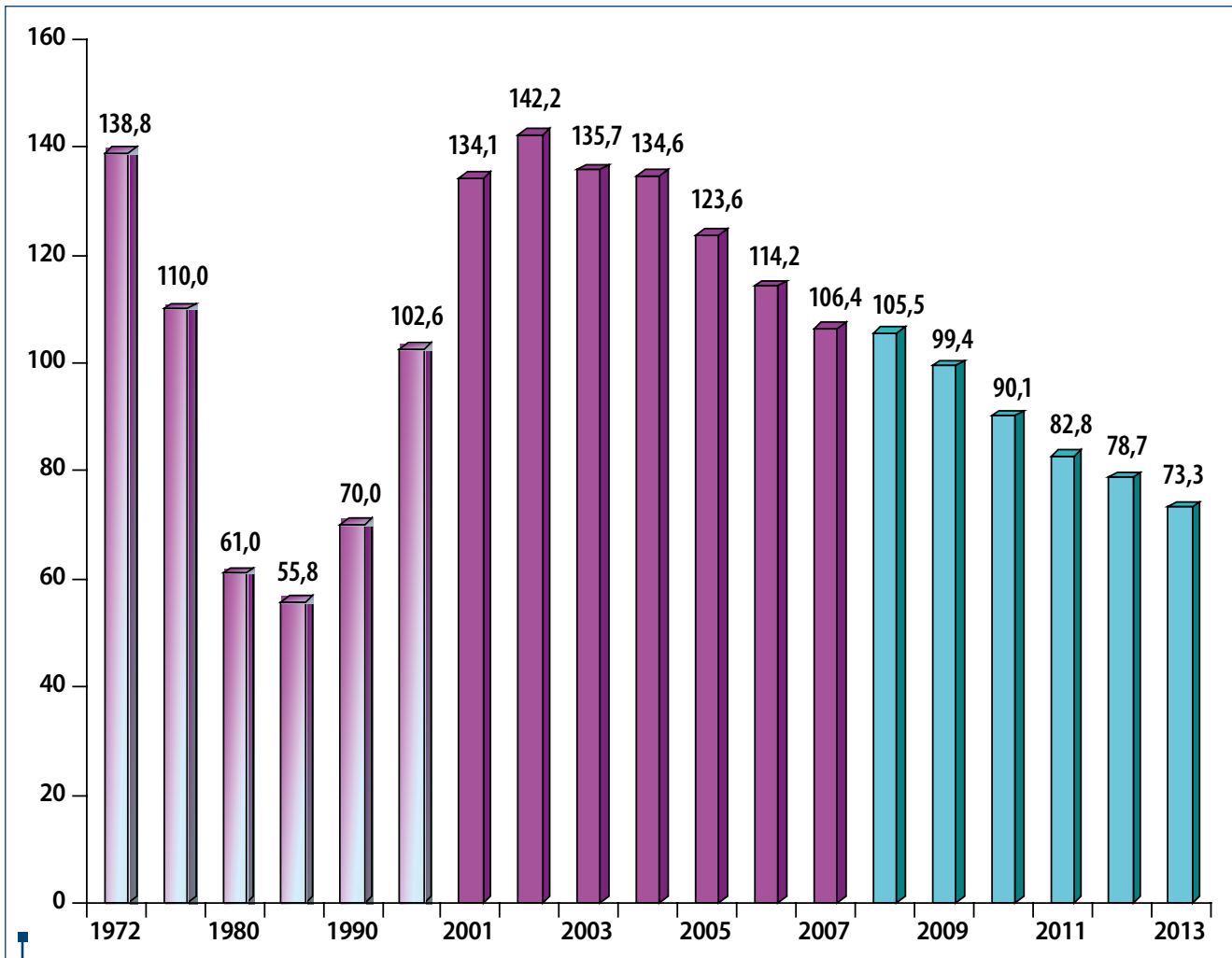


Figura 1. Incidența globală a TB în România în perioada 1972-2013

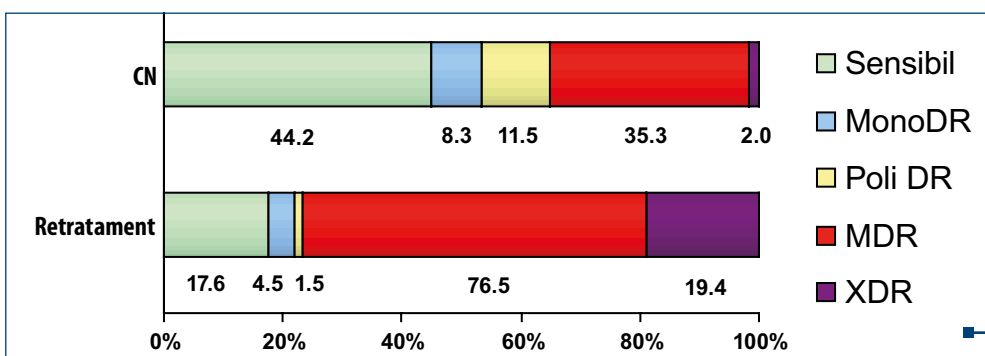


Figura 2. Sensibilitatea tulpinilor de M.tb izolate de la pacienți Caz Nou și Retratament

rezistența apare din cauza acumulării secvențiale de mutații în genele-țintă, ceea ce face ca tratamentul să fie mult mai dificil. S-a observat că sensibilitatea tulpinilor de M. tb, izolate de la pacienți cu caz nou, este în proporție de 44,2% față de tulpinile selectate de la pacienți cu retratamente, care se situează la 17,8%. Frecvența tulpinilor MDR selectate de la pacienții cu caz nou este în proporție de 35,3%, față de cele selectate de la pacienții cu retratamente - 76,5%. Sensibilitatea tulpinilor scade dramatic în cazul pacienților cu retratamente³ (Figura 2).

Ca răspuns la această problemă alarmantă, s-au dezvoltat diverse tehnici rapide de diagnostic care dau informații atât în legătură cu apartenența tulpinii la complexul *tuberculosis*, cât și în legătură cu prezența mutațiilor de rezistență.

În cadrul Laboratorului Național de Referință (LNR) București am evaluat concordanța rezultatelor între metoda genetică⁵ și metoda fenotipică⁴. Am testat tulpinile izolate de la un număr de 40 de pacienți MDR (multidrog-rezistenți) incluși în tratament GLC (Green Light Commity); metoda genetică utilizată a fost LPA (Line probe assay) HAIN.

Datele din literatură arată că, din punct de vedere al sensibilității și specificității testului GenoType MTBDR plus pentru RMP (Rifampicină), sensibilitatea este 98,1%, iar specificitatea 98,7%, respectiv HIN (Izoniazidă) sensibilitatea este 84,3%, iar specificitatea 99,5%^{5,16}.

Pentru testul GenoType MTBDR *sl* pentru OFL (Ofloxacin) sensibilitatea este 90,2%, specificitatea 100%, AMK (Amikacină) - sensibilitatea 83,3%, specificitatea 100%, CAP (Capreomicină) - sensibilitatea 86,8%, specificitatea 99,1%, EMB (Etambutol) - sensibilitatea 59% și specificitatea 100%.

Obiectiv

Studiul actual își propune prezentarea rezultatelor obținute la testarea genetică LPA, comparativ cu testarea fenotipică a aceluiași lot de tulpini.

Ipoteza de studiu

Rezultatele obținute la antibiograma fenotipică pe mediu solid și cele obținute prin testarea tulpinilor prin metoda genetică sunt valide și de încredere.

Scop

Stabilirea concordanței dintre rezultatele obținute în Laboratorul Național de Referință București și Laboratorul Centrului de Excelență MDR Bisericani prin testare fenotipică și rezultatele obținute prin testare genotipică în LNR București.

Considerente etice

Tulpinile selectate pentru testare au provenit de la pacienți din cele două centre, MDR București și Bisericani. Rezultatele obținute la testarea genetică au fost folosite pentru analiza comparativă cu rezultatele fenotipice obținute în cele două laboratoare.

Material și metodă

Studiul a fost de tip retrospectiv.

Au fost selectate pentru studiu un număr de 40 de tulpini de *M. tuberculosis* care au fost testate genetic. Tulpinile testate au fost izolate pe medii de cultură Lowenstein-Jensen (L-J), respectând procedura de lucru și toate măsurile de biosiguranță. Au fost păstrate în laboratoarele de referință în apă glicerinată 5% în congelator (la -20°C) și au fost recultivate în laboratorul de origine pe mediu L-J și trimise în LNR^{4,11} în vederea efectuării extracției de ADN mycobacterian pentru testarea genetică^{5,6,8}.

Inițial, toate tulpinile au fost testate fenotipic^{4,8}. Cele două laboratoare participă la scheme de control extern de calitate, LNR din București având ca SRNL (Laborator Supranațional de Referință) laboratorul de la Stockholm.

Tulpinile au fost trimise în condiții de biosiguranță^{6,12}, însoțite de un tabel cu rezultatele obținute la testarea fenotipică. Metoda utilizată pentru testarea fenotipică a fost metoda proporțiilor, tehnica indirectă. Trusa de testare are în compoziție două tuburi martor și câte un tub pentru HIN 0,2 μg/ml; RMP 40 μg/ml; EMB 2 μg/

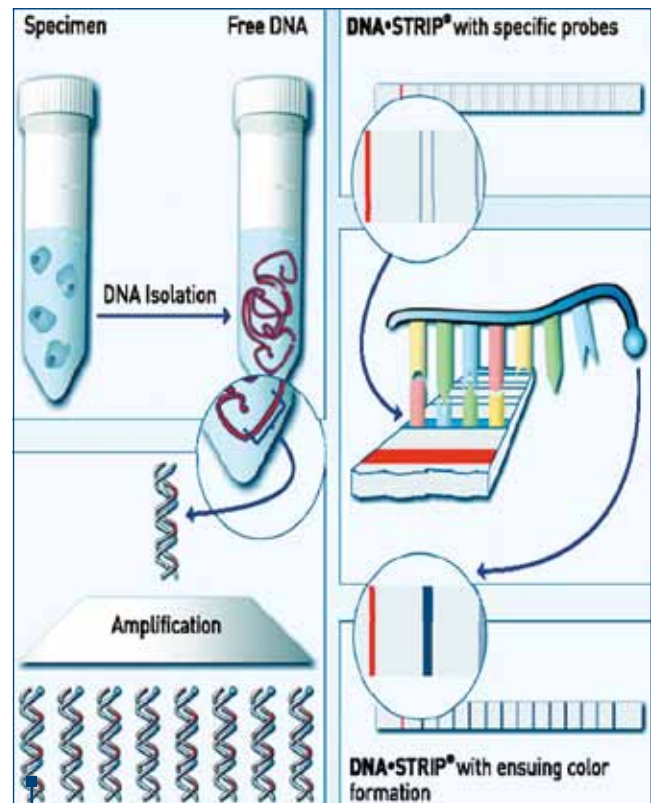


Figura 3. Principiul testului genetic

ml; KAN(Kanamycină) 30 μg/ml ; OFL 2 μg/ml; CAP 40; μg/ml; AMK 30 μg/ml.

Tulpinile au fost testate genetic prin metoda LPA (line probe assay) și s-au utilizat truse GenoType MTBDR plus (HAIN Lifescience, GmbH, Nehren, Germania) care detectează mutațiile comune din gena *rpoB*, din genele *katG* și *inhA* (răspunzătoare de rezistența pentru RMP și HIN) și apartenența tulpinii la complexul *M. tb*. Pentru tuberculostatice de linia a doua și Etambutol s-au utilizat truse GenoType MTBDR*sl* (HAIN Lifescience, GmbH, Nehren, Germania) care evidențiază mutațiile din genele *embB*, *rrs* și *gyrA* (rezistența pentru EMB, AMK, KAN, CAP, OFL)⁷.

Ca principiu, testarea LPA urmărește patru etape mari: extracția de ADN, amplificarea ADN, hibridizarea ADN, urmată de documentarea testului și interpretarea rezultatelor (Figura 3). Cantitatea de ADN utilizată pentru amplificare a fost de 5 μl^{5,7}. Pentru validarea testului s-au utilizat martor negativ și pentru martorul pozitiv tulpina de referință H37Ra (ATCC 25177).

Variabilele studiate: sunt categoricale, dihotomice (sensibil sau rezistent). Mutație detectată/ nedetectată.

Analiza statistică

Metoda statistică folosită a fost de comparare a rezultatelor. S-au calculat procentele de concordanță și coeficientul de concordanță kappa între cele două metode pentru lotul studiat. Nu se pot calcula specificitatea și predicția sensibilității, deoarece tulpinile studiate au fost doar tulpini cu rezistență cunoscută MDR.

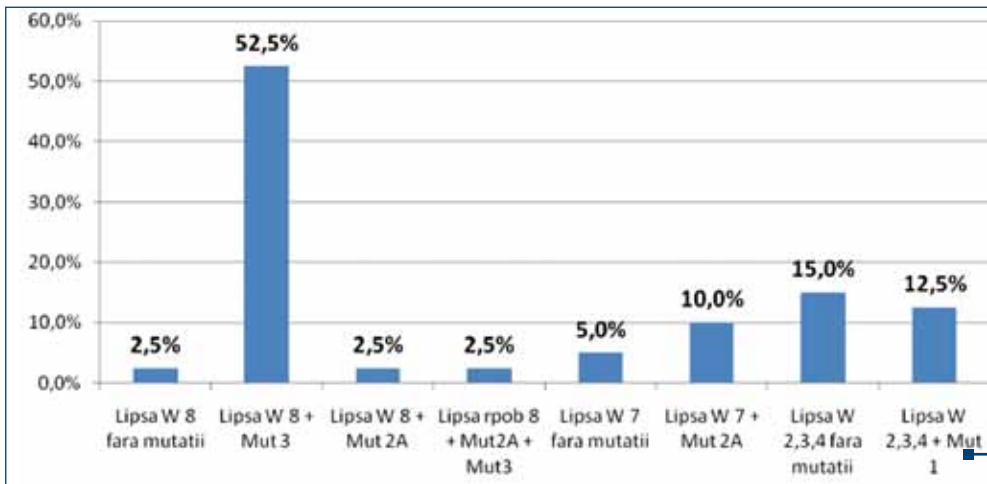


Figura 4. Frecvența mutațiilor în regiunea rpoB

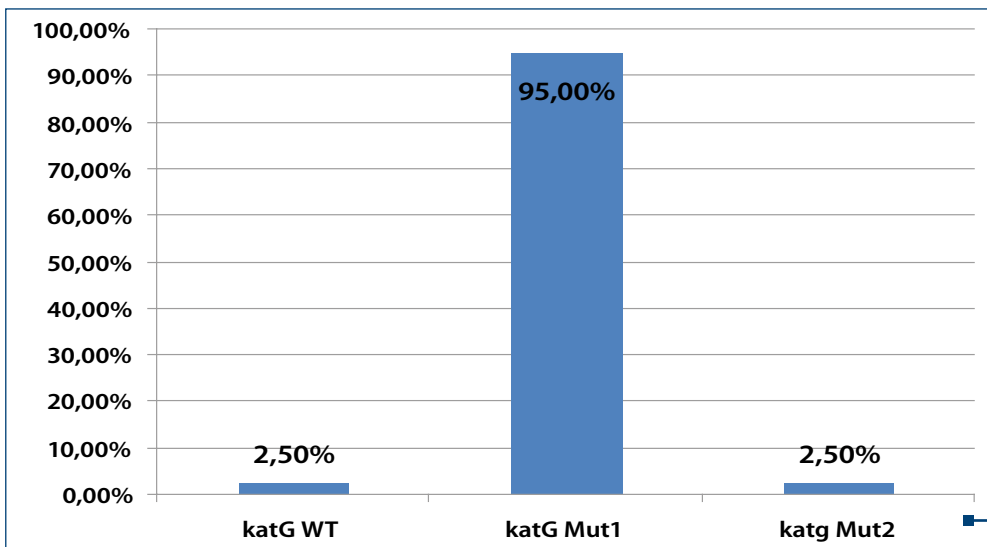


Figura 5. Mutații în regiunea katG

Rezultate și discuții

La testarea fenotipică, toate tulpinile au avut rezistență HIN și RMP. Genetic pentru testarea sensibilității la HIN, o tulpină nu a avut nici o mutație în regiunile inhA și katG, dar fenotipic a fost rezistentă, știut fiind că baza moleculară a rezistenței la HIN implică o varietate de cauze cum ar fi inserții, deleții și mutații punctiforme.

Pentru testarea sensibilității la RMP, două dintre tulpini nu au prezentat nici o mutație în regiunea rpoB, fenotipic fiind rezistente, ceea ce poate semnifica existența altor mutații compensatorii în domeniile rpoA/rpoC, mutații care nu se găsesc pe stripul testului din trusa GenoType MTBDR *plus*^{14,15}.

În cadrul rpoB, cea mai frecventă mutație este Mut 3-52%, însoțită de absența benzii W8, Mut 1- 12,5% și Mut 2A-10% (Figura 4).

Pentru rezistența înaltă la Isoniazidă în domeniul katG, cea mai frecventă este Mut1 - 95 % (Figura 5).

Pentru rezistența scăzută la Isoniazidă în inhA, cea mai frecventă este Mut - 30% (Figura 6).

Concordanța între cele două metode pentru HIN și RMP

Rezultatele obținute prin cele două metode fenotipic și genetic se suprapun în proporție de >=95%. Este con-

siderată ca referință testarea fenotipică a cărei sensibilitate de detecție a populației rezistente este de 1%, față de cea genetică, a cărei putere de discriminare a aceleiași populații este de 5% .

Un procent de 2,5% din tulpinile testate pentru HIN nu au prezentat nici o mutație în regiunea katG și inhA, dar fenotipic au fost rezistente. Concordanța între cele două metode a fost de 97,5%, cu k=0,975.

Pentru RMP, procentul de concordanță este de 95%, cu un k=0,950. În timpul cultivării se pot selecta toate variantele de mutații spontane, ceea ce face ca antibiograma fenotipică la o tulpină cu multe pasaje să fie fals rezistentă. De asemenea, în cazul tulpinilor heterorezistente, populația sensibilă este înlocuită în timp de cea rezistentă. În cazul infecțiilor cu tulpini mixte (populație mixtă rezistentă și sensibilă care genetic înseamnă prezența a două tulpini diferite), detecția rezistenței depinde de mutații, anumite mutații fiind detectate doar dacă toată populația bacilară este rezistentă (Figura 7).

În cazul analizării rezultatelor obținute la testarea drogurilor de linia a doua și a EMB, concordanța cea mai mică între cele două metode utilizate a fost pentru EMB - 70% și k=0,675, confirmând sensibilitatea scăzută a metodei genetice pentru acest drog.

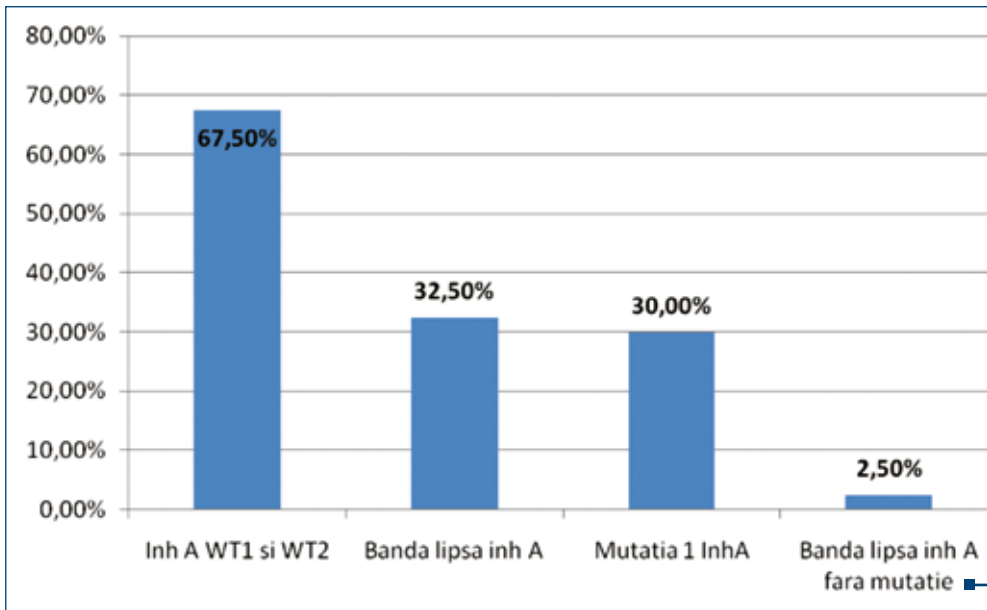


Figura 6. Mutații în regiunea inhA

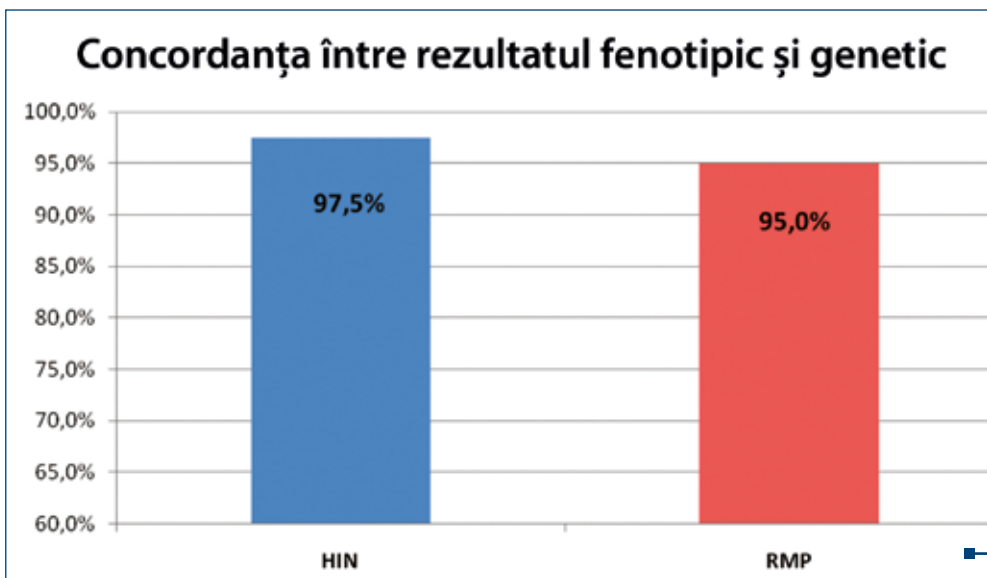


Figura 7. Rezultate testare HIN și RMP fenotipic și genetic

Pentru AMK și CAP, rezultatele au fost superpozabile 100%, cu $k=1$ pentru cele două metode utilizate. La fluoroquinolone, concordanța a fost de 95%, $k=0,925$, iar pentru KAN - 94,9%, cu $k=0,949$ (Figurile 8 și 9).

Concluzii

Care metodă este mai potrivită pentru a obține un răspuns rapid, real, concludent și semnificativ clinic? „Standardul de aur” pentru o metodă de testare este reprezentat de detecția unui procent cât mai mic de bacili rezistenți prezenți într-o tulpină. Metodele genetice și noile tehnologii sunt potrivite pentru screening-ul MDR-TB și reduc mult timpul de diagnostic, completând “standardul de aur” reprezentat de testarea fenotipică (cultura în mediu lichid).

Testarea genetică ne permite abordarea precoce a

pacientului cu tuberculoză, certificarea diagnosticului de tuberculoză, cu evidențierea spectrului de chimio-sensibilitate, ceea ce permite administrarea de tratament țintit cu droguri eficiente și cu o rată crescută de negativare și vindecare.

Eșecul terapeutic este datorat atât mecanismului de rezistență, care este un fenomen fenotipic datorat mutațiilor, cât și mecanismului de persistență, fenomen genotipic datorat mutațiilor, tratamentul fiind activ doar asupra bacililor aflați în multiplicare.

Ideal este să utilizăm metoda care să detecteze o proporție cât mai mică din populația bacilară drog-rezistentă. Optimizarea regimurilor terapeutice, împreună cu diagnosticul rapid și testarea sensibilității pentru liniile 1 și 2 de tratament îmbunătățesc mult rezultatul clinic. ■

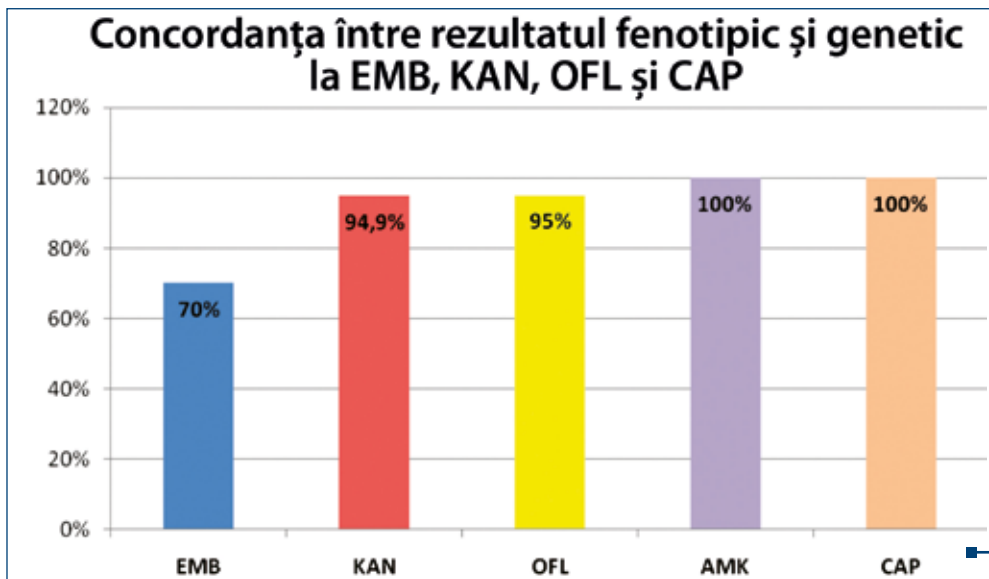


Figura 8. Concordanța rezultatelor obținute prin cele două metode

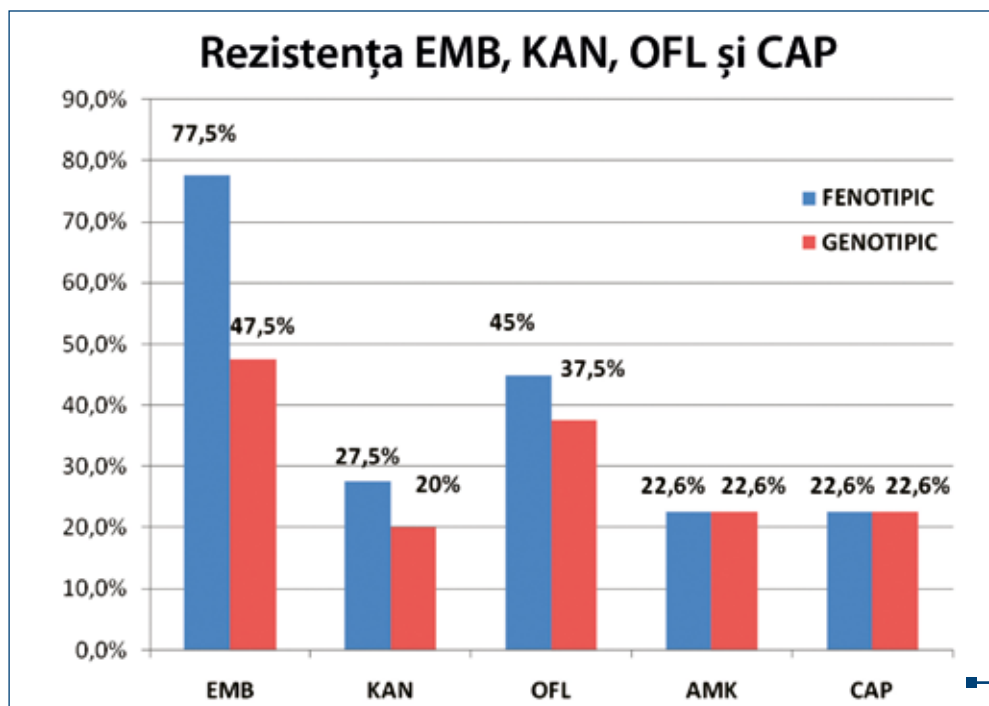


Figura 9. Reprezentarea rezultatelor obținute prin cele două metode

Bibliografie

- WHO Global tuberculosis report 2013 Geneva 27.
- WHO. Multidrug and extensively any-resistant TB(M/XDR-TB) 2010. Global Report on surveillance and response. *WHO/HTM/TB/2010.3*. Geneva
- T. Colston MJ, Cole S. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *The Lancet*, March 1993, Volume 341, Issue 8846, 647-651
- Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Maher HT, Meissner G, Mitchison D.A, Sulal L, 1963 Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull WHO* 29, 565-578.
- WHO handbook for guideline development. Geneva, World Health Organization, 2012
- WHO Tuberculosis laboratory biosafety Manual WHO/HTM/TB2012.11
- Barnard M, Parsons L, Miotto P, Cirillo D, Feldmann K, Gutierrez C, Akos Somoskovi A. Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay. *Laboratorz Manual for Resource-Limited Settings - FIND*, 2012
- Homorodean D, Moldovan O, Diculencu D, Chiriac G, Muntean I, Îndrumar de tehnici de laborator de bacteriologie BK, elaborat sub coordonarea PNCT, Bucuresti, 2005
- Folkvardsen DB, Sevansson E, O.Thomsen V, Rasmussen EM, Bang D, Werngren J, Hoffner S, Hillemann D, Rigouts L. Can molecular methods detect 1% isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis? *J Clin Microbiol*, May 2013; 51(5): 1596-1599
- Daniela Galieta Minca, Florentina Furtunescu - Metode si instrumente in cercetarea operationala CPSS 2009
- WHO/CSD/CSRL/LYO/2004.9- Background to the amendments adopted in the 13th revision of the United Nations Model Regulations guiding the transport of infectious substances.
- Ghid de reglementări pentru transportul substanțelor infecțioase. <http://www.ms.ro>
- Lallo U.G. Drug resistant tuberculosis: reality and potential threat. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:255-258.
- Chryssanthou E, Angeby K. The GenoType MTBDR plus assay for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis in Sweden. *APMIS* 2011, 120:405-409.
- Vijdea R, Stegger M, Sosnovskaja A, Andersen AB, Thomsen VO, Bang D. Multidrug-resistant tuberculosis: rapid detection of resistance to rifampin and high or low levels of isoniazid in clinical specimens and isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27:1079-86.
- Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Genotype MTBDR assays for the diagnosis of multidrug resistant tuberculosis: a meta analysis. *Eur Respir J* 2008; 32:1165-1174.