

terial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clin Microbiol Infect.* 2020, 26(10): 1395–1399.

3. Lansbury L., Lim B., Baskaran V. et al. *Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis.* *J Infect.* 2020, 81(2): 266-275.

4. Ma L., Wang W., Le Grange J.M. et al. *Coinfection of SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens.* *Infect Drug Resist.* 2020, 13: 3045-3053.

5. MacIntyre C.R., Chughtai A.A., Barnes M. et al. *The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a(H1N1) pdm09.* *BMC Infect Dis.* 2018, 18(1): 637.

6. National Institute for Health and Care Excellence (NICE) COVID-19 rapid guideline: managing suspected or confirmed pneumonia in adults in the community. 2020.

<https://www.nice.org.uk/guidance/ng165/chapter/4-Managing-suspected-or-confirmed-pneumonia>

7. Rawson T.M., Moore L.S.P., Zhu N. et al. *Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing.* [published online ahead of print, 2020 May 2]. *Clin Infect Dis.*, ciaa530.

8. Sharov K.S. *SARS-CoV-2-related pneumonia cases in pneumonia picture in Russia in March-May 2020: Secondary bacterial pneumonia and viral co-infections.* *J Glob Health.* 2020, 10(2): 020504.

9. Townsend L., Hughes G., Kerr C. et al. *Bacterial pneumonia coinfection and antimicrobial therapy duration in SARS-CoV-2 (COVID-19) infection.* *JAC Antimicrob Resist.* 2020, 2(3): dlaa071.

10. Yang S., Hua M., Liu X., et al. *Bacterial and fungal co-infections among COVID-19 patients in intensive care unit.* *Microbes Infect.* 2021 Mar 5 : 104806.

CZU: 616.24-002.5-036.87:576.852.211+576.8.097.22

<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2021.1-69.08>

NIVELUL DE REZISTENȚĂ FENOTIPICĂ ȘI PATERNUL DE MUTAȚII GENICE A *M. TUBERCULOSIS*

Nelly CIOBANU, Alexandru CODREANU, Nadejda ȚURCAN,
Ecaterina NOROC, Valeriu CRUDU, dr. în șt. med., conf. cercet.

IMSP Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, R.Moldova

e-mail: nellyka.ciobanu@gmail.com

Rezumat

Ajustarea concentrațiilor minime inhibitorii pentru preparatele antituberculoase utilizate în metodele de cultură clasice și obținerea unor date mai exacte despre nivelul de rezistență la medicamente, face posibilă evaluarea cazurilor cu rezultate diferite la metodele fenotipice și genice de testare a rezistenței antituberculoase. Evaluarea diferitor tipuri de rezistență genică, 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. Ori de câte ori testarea rezistenței *M. tuberculosis* prin metode moleculare permite, rezultatele trebuie să fie raportate cu mutațiile specifice detectate și cu descrierea implicațiilor clinice ale prezentei mutației.

Cuvinte-cheie: *Mycobacterium tuberculosis*, testarea sensibilității către medicamente, metode molecular genetice

Summary. Levels of phenotypic resistance and the pattern of gene mutations of *M. tuberculosis*

The adjustment of the minimum inhibitory concentrations for anti-tuberculosis drugs used in classical cultivation methods and the obtaining of more accurate data on the level of drug resistance, makes it possible to evaluate cases with different results to phenotypic and genotypic methods of anti-tuberculosis resistance testing. The 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 ultimately will positively influence the duration and results of treatment. Whenever testing of *M. tuberculosis* resistance by molecular methods allows, the results should be reported with the specific mutations detected and the description of the clinical implications of this mutation.

Key-words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug susceptibility testing, molecular-genetic methods

Резюме. Уровень фенотипической устойчивости и тип генных мутаций у *M. tuberculosis*

Регулировка минимальных ингибирующих концентраций противотуберкулезных препаратов, используемых в классических методах культивирования, и получение более точных данных об уровне лекарственной устойчивости, позволяет оценивать случаи с разными результатами фенотипических и генотипических методов противотуберкулезной устойчивости.

Оценка различных типов генотипической устойчивости с описанием мутаций, придающих низкую или высокую устойчивость, согласуется с уровнем фенотипической устойчивости, а также позволяет корректировать схемы лечения, что в конечном итоге положительно влияет на продолжительность и результаты лечения. Если позволяет тестирование устойчивости *M. tuberculosis* молекулярными методами, результаты должны быть сообщены с указанием конкретных обнаруженных мутаций и описанием клинических последствий этой мутации.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, определение лекарственной устойчивости

Introducere. 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 (1, 2, 3).

La etapa actuală, depistarea cazurilor de TB rezistentă și în special a celor cu rezistență extinsă, tot mai frecvent sunt grevate de mai multe dificultăți, influențate de variabilitatea agentului patogen. Diagnosticarea cu întârziere sau incorectă a cazurilor de TB rezistentă, deși sunt aplicate metode sofisticate de testare a rezistenței, poate influența negativ rezultatele tratamentului pacienților, care în consecință va duce la transmiterea infecției tuberculoase rezistente în societate. În ultimii ani metodele rapide de diagnostic a rezistenței la medicamentele antituberculoase au fost studiate și dezvoltate foarte aprofundat. Au fost elaborate și implementate metode rapide noi, moleculare pentru testarea rezistenței către preparatele de linia 1 și unele de linia 2 [4, 5, 6, 7, 8].

Testarea sensibilității la medicamente (TSM) este obiectul modernizării continue în microbiologia tuberculozei. Cel mai des utilizată pentru testarea sensibilității *M. tuberculosis*, atât în laboratoarele din republică, cât și peste hotare, este metoda indirectă, și anume metoda concentrațiilor absolute. Neajunsul principal al metodei descrise constă în aceea, că este laborioasă și de lungă durată. Rezultatele testării rezistenței către medicamente pot fi influențate de mai mulți factori, care depind de natura și proprietățile agentului patogen, de metoda aplicată pentru acest scop, de tipul de rezistență (fenotipică sau genotipică), de tipul pacientului, sistarea tratamentului pe parcursul colectării materialului patologic pentru testare prin metodele culturale [9, 10].

Testele moleculare disponibile comercial au fost recent implementate pentru a detecta mutațiile asociate cu rezistența, în special la izoniazidă și rifamicină. În plus, laboratoarele de referință folosesc secvențierea extinsă a ȳintelor moleculare pentru a urmări mutațiile asociate cu rezistența. Metoda lichidă pentru testarea sensibilității *M. tuberculosis* către medicamente, utilizează un mediu lichid standardizat (Middlebrook 7H9) și este un sistem bine stabilit, semi-automatizat, care oferă rezultate reproductibile pentru medicamentele antituberculoase de primă linie pe baza testării concentrației critice, utilizând echipamentul MGIT 960 (BD, Sparks, MD, SUA). Acest sistem permite de asemenea și TSM pentru medicamentele antituberculoase de linia 2. Programa computerizată TBeXiST pentru interpretarea TSM pe baza echipamentului BACTEC MGIT 960 a fost dezvoltată pentru a permite monitorizarea continuă a creșterii și o analiză mai detaliată a rezultatelor obținute. În acest studiu am folosit echipamentul BACTEC MGIT 960 echipat cu software-ul TBeXiST pentru a stabili TSM cantitativ pentru *M. tuberculosis*. Procedura a fost concepută pentru a combina obiectivele de testare a metodei proporțiilor și a metodei concentrațiilor critice cu monitorizarea continuă a creșterii bacteriene. Am validat specificitatea rezistenței detectate prin evaluarea concordanței cu profilurile genetice ale rezistenței. TSM cantitativ oferă rezultate cu privire la nivelul de rezistență (cantitativ), care va ajuta la optimizarea regimurilor de tratament pentru pacienții M/XDR-TB.

Scopul studiului. Estimarea coerenței dintre diferite niveluri de rezistență fenotipică și paternul de mutații genice la pacienții cu tuberculoză.

Necesitatea determinării rezistenței *M. tuberculosis* către preparatele antituberculoase este indiscutabilă. Discrepanțele existente între rezultatele obținute la testarea rezistenței *M. tuberculosis* prin metode fenotipice și testele genotipice, indică la necesitatea de a avea informații în plus, pentru a decide tulpină „sensibilă” sau tulpină „rezistentă”.

Tabelul 1

Gene și mutații care conferă rezistență către medicamente

Isoniazid	Rifampicin	FQ	AMG
<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 (i.e. gyrA D94G)	1462 A-T
MUT2 S315T2	MUT 2A H526Y (H445Y)	gyrA MUT3D (i.e. gyrA D94H)	1484 G-T
	MUT 2B H526D (H445D)	gyrA MUT3B (i.e. 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 (i.e. gyrA A90V)	-10 G-A
MUT1 c-15t		gyrA MUT2 (i.e. gyrA S91P)	-12 C-T
MUT2 a-16g		gyrA MUT3A (i.e. gyrA D94A)	-14 C-T
MUT3 t-8c		gyrB MUT1 (i.e. gyrB N538D)	-43 A-T
MUT4 t-8a		gyrB MUT2 (i.e. gyrB E540D)	

Rezultatele utilizării diferitor scheme, inclusiv și Isoniazidă în doze mari, pentru tratamentul pacienților cu MDRTB sunt descrise în literatura de specialitate din ultimii ani. Tot odată nu sunt descrise unele criterii clare în ce situații și care pacienți pot fi incluși în tratamentul cu doze mari de INH (Isoniazidă). De asemenea este binevenită și evaluarea posibilităților de utilizare a altor doze la alte preparate de linia 1 (RIF-Rifampicină) și pentru tratamentul MDR&XDRTB (Moxifloxacină). Evaluarea rezultatelor tratamentului pacienților TB cu diferite grade de rezistență și scheme de tratament (INH doze mari) va oferi astfel de informații pentru clinicieni, astfel posibil va influența și la rezultatele tratamentului unor astfel de pacienți.

Metode de cercetare. Testarea rezistenței *M. tuberculosis* a fost efectuată pe medii solide (LJ) 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 TBXDR. Pentru evaluarea corelației dintre CMI (Concentrația minimă inhibitorie) și spectrul de mutații au fost utilizate metode molecular genetice GenoType MTBDRplus ver.2.0 și MTBDRsl ver.2.0.

Rezultate obținute. Etapa 1. A fost studiată baza de date a rezultatelor investigațiilor molecular genetice din LNR pentru estimarea ponderii diferitor mutații responsabile de rezistența M.tb către preparatele antibacteriene. De asemenea au fost evaluate discrepanțele în rezultatele metodei convenționale (BACTEC MGIT 960) și metodelor molecular genetice (GeneXpert MTB/RIF, GeneXpert MTB/Ultra GenoType MTBDRplus, MTBDRsl).

Au fost analizate 4570 rezultate ale metodei molecular genetice MTBDRplus, realizate în Laboratorul Național de Referință pe parcursul ultimilor doi ani (2018–2019). 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 de rezistența a 2067 tulpini de *M.tuberculosis* a fost mutația *rpoB* cu codonul S531L TCG-TGG, și 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. La testarea Isoniazidei au fost sensibile 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 prezente în rezultatele metodei culturale (MGIT 960) și molecular genetice – GeneXpert, GenoType MTBDRplus, MTBDRsl.

Astfel, la evaluarea a 1327 de rezultate paralele obținute prin metoda culturală convențională BACTEC MGIT 960 și metoda molecular genetică GeneXpert MTB/RIF, GeneXpert MTB/Ultra sau înregis-

Tabelul 2

Discrepanțele prezente în rezultatele metodei culturale convenționale (MGIT 960) și molecular genetice (GeneXpert, GenoType MTBDRplus, MTBDRsl).

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	LPA Sens	LPA 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	LPA Sens	LPA Rez	Total
Cultura INH Sens	763	7	770
Cultura INH Rez	14	854	868
Discrepanțe Sens, %	0.9		1638
Discrepanțe Rez; %	1.6		
BACTEC MGIT 960	AG Sens	AG Rez	Total
Cultura FQ Sens	770	25	795
Cultura FQ Rez	25	277	302
Discrepanțe Sens, %	3.1		1097
Discrepanțe Rez; %	8.3		

trat 2,4% discrepanțe la rezultatele sensibile pentru Rifampicină (22 rezultate din 932 tulpini sensibile) 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, și MTBDRplus au fost înregistrate 4,2% rezultate discrepante la tulpinile sensibile la 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).

Rezultate importante au fost obținute la evaluarea metodelor culturale, care sunt recomandate de OMS ca “standardul de aur” în diagnosticul microbiologic al tuberculozei și metodele rapide, molecular genetice, care sunt pe larg implementate astăzi în practica laboratoarelor din domeniu, ca metode de rutină. La

evaluarea a 1679 de rezultate paralele obținute prin metoda MGIT 960 și MTBDRplus sau înregistrat 1,3% discrepanțe la rezultatele sensibile pentru RIF (12 din 941 tulpini sensibile) și 1,1% la rezultatele rezistente pentru Rifampicină (8 din 738 tulpini rezistente).

La evaluarea a 1638 de rezultate paralele obținute prin metoda culturală MGIT 960 și metoda MTBDRplus sau înregistrat 0,9% discrepanțe la rezultatele sensibile pentru Isoniazidă (7 din 740 tulpini sensibile) și 1,6% la rezultatele rezistente pentru Isoniazidă (14 din 878 tulpini rezistente).

Cele mai elocvente rezultate au fost depistate la evaluarea rezultatelor paralele obținute prin metoda culturală convențională BACTEC MGIT 960 și metoda MTBDRsl. Au fost evaluate 1097 de rezultate paralele obținute prin metoda culturală convențională

BACTEC MGIT 960 și metoda molecular genetică GenoType MTBDRsl. Sau înregistrat 3.1% discrepanțe la rezultatele sensibile pentru Floroquinolone (25 din 795 tulpini sensibile) și 8,3% la rezultatele rezistente pentru Floroquinolone (25 din 302 tulpini rezistente).

Concluzii: a) Mutațiile *katG315* care conferă rezistență de nivel înalt la Isoniazidă, sau depistat la 87,9% din tulpinile *M.tuberculosis* complex evaluate, și în 2,6% sa depistat mutația *inhA* (rezistență joasă). b) 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. c) În 23,4% cazuri rezistența genică la Rifampicină a fost dedusă prin lipsa unei gene sălbatice.

Etapa 2. În studiu au fost înrolați 385 pacienți cu TB pulmonară. Toți acești pacienți au fost informați despre scopurile și sarcinile studiului, după care fiecare a semnat acordul informat. Au fost recoltate minimum 2 probe de spută, dintre care una matinală. Probele au fost examinate prin microscopia fluorescentă, GeneXpert MTB/RIF sau t MTB/RIF Ultra, apoi inoculate pe medii de cultură lichide (MGIT 960) și pe medii de cultură solide (LJ). Prin metode genotipice și fenotipice au fost studiate 237 tulpini *M.tuberculosis*. Pentru testarea rezistenței fenotipice a fost utilizată metoda TB eXiST cu soft-arul EpiCentru din sistemul MGIT 960. Au fost testate 9 preparate antituberculoase la diferite concentrații minime inhibitorii (CMI).

Corelația dintre rezultate testare rezistență genotipică și nivel rezistență fenotipică a *M.tuberculosis* către Isoniazidă. Astfel, prin metoda genotipică MTBDR_{plus} rezistența tulpinilor *M.tb* către Isoniazidă a fost determinată în 93,2% cazuri (n=221) și în 6,8% (n=16) cazuri nu au fost depistate mutații sau lipsa genelor sălbatice și tulpinile în cauză au fost evaluate ca sensibile. În 220 cazuri au fost depistate mutații care conferă rezistență și 1 caz nu au fost depistate mutații, dar a fost depistată lipsa unei gene sălbatice. Cel mai frecvent au fost depistate mutațiile *katGS315* împreună cu mutația *inhA* – 119 cazuri și în 101 cazuri au fost depistată doar mutația *katG S315*. Mutația *inhA* aparte, fără *katG* nu a fost depistată nici într-un caz în acest studiu.

Prin metoda BACTEC MGIT 960 rezistența la Isoniazidă a fost confirmată în 94.1% cazuri (n=223) și în 5,9% cazuri (n=14) tulpinile testate au fost sensibile la concentrațiile minim inhibitorii. La testarea acestor tulpini la concentrații mai mari au fost depistate 4 tulpini (1,8%) sensibile la concentrația de 3,0 μg/ml și o tulpină la concentrația de 1,0 μg/ml.

Corelația dintre rezultate testare rezistență genotipică și nivel rezistență fenotipică a *M.tuberculosis*

către Rifampicină. Prin metoda genotipică MTBDR_{plus} rezistența tulpinilor *M.tb* către RIF a fost determinată în 92,4% (n=219) și în 7,6% (n=18) cazuri nu au fost depistate mutații sau lipsa genelor sălbatice și tulpinile în cauză au fost evaluate ca sensibile.

Dintre 219 cazuri care au fost evaluate cu rezistență genotipică, cel mai frecvent au fost depistate mutațiile care conferă rezistență înaltă. Astfel, cel mai frecvent au fost depistate mutații *rpoB* codonul S531L (S450L)- 88,1% cazuri (n=195) și mutațiile MUT 2A H526Y (H445Y) MUT 2B H526D (H445D) – 1.4% cazuri (n=3). În 10,5% cazuri (n=23) au fost depistate mutații care conferă rezistență joasă -1,4% (n=3) sau a fost lipsa de o genă sălbatică – 9,1% cazuri (n=20).

Prin metoda MGIT 960 rezistența la RIF a fost confirmată în 92,4% cazuri (n=219) și în 7,6% (n=18) cazuri tulpinile testate au fost sensibile la concentrațiile minim inhibitorii. La testarea acestor tulpini la concentrații mai mari au fost depistate 3 tulpini sensibile la concentrația de 2,0 μg/ml și 9 tulpini la concentrația de 3.0 μg/ml.

Corelația dintre rezultate testare rezistență genotipică și nivel rezistență fenotipică a *M.tuberculosis* către Fluoroquinolone (FQ). Prin metoda genotipică MTBDR_{sl} rezistența tulpinilor *M.tb* către FQ a fost determinată în 23.2% cazuri (n=55) și în 76,8% (n=182) cazuri nu au fost depistate mutații sau lipsa genelor sălbatice și tulpinile în cauză au fost evaluate ca sensibile. Dintre 55 cazuri care au fost evaluate cu rezistență genotipică, doar în 30.1% cazuri (n=17) au fost depistate mutațiile care conferă rezistență înaltă. Astfel mutația *gyrA* MUT3C (D94G) , a fost depistate doar în 29,1% cazuri (n=16) și mutația *gyrA* MUT3D (D94H) într-un singur caz 1,8%. În 50,9% cazuri (n=28) au fost depistate mutații care conferă rezistență joasă sau a fost lipsa de o genă sălbatică –18,2% cazuri (n=10). Printre mutațiile care conferă rezistență joasă în 23,6% cazuri (n=13) sa depistat mutația *gyrA* MUT1 (A90V), în 12,7% cazuri (n=7) sa depistat mutația *gyrA* MUT2 (S91P) și în 14,5% cazuri (n=8) sa depistat mutația MUT3A.

Prin metoda MGIT 960 rezistența la FQ a fost confirmată în 22,8% (n=54) și în 77,2% (n=183) cazuri tulpinile testate au fost sensibile la CMI. La testarea acestor tulpini la concentrații mai mari au fost depistate 37 tulpini sensibile la concentrația de 1,0 μg/ml și de 2,0 μg/ml.

Discuții. Testarea *M.tuberculosis* la concentrații mai mari pentru RIF și INH, dar în special pentru FQ, poate fi considerată ca o opțiune avantajoasă pentru o combinație terapeutică optimală în tratamentul pacienților cu TBMDR la care preparatele de

linia 2 prezintă rezistență. În studiul dat, tulpinile *M. tuberculosis* selectate au fost în majoritatea absolută a cazurilor doar cu mutații care conferă rezistență înaltă față de preparatele specifice. În cazul prezent pentru Isoniazidă și Rifampicină, și mai puțin pentru fluorochinolone.

Astfel, din 237 tulpini rezistente la Isoniazidă, nu a fost depistată nici într-un caz doar mutația *inhA* singură, care conferă rezistență joasă față de acest preparat. În schimb mutațiile care conferă rezistență înaltă au fost prezente 99,5% tulpini studiate. Pentru pacienții cu o mutație *rpoB*, codonul D516V (D435V), într-un specimen direct sau din tulpină izolată, trebuie utilizată o metodă fenotipică pe bază de cultură, pentru testarea rezistenței la Rifampicină la diferite concentrații. La fel, pentru pacienții cu o mutație *inhA*, fără mutația *katG*, într-un specimen direct sau din tulpină izolată, trebuie utilizată o metodă fenotipică pe bază de cultură, pentru testarea rezistenței la Isoniazidei la diferite concentrații. La toți pacienții etiologic confirmați cu *M. tuberculosis*, cu o mutație *rpoB*, codonul S531L și H526Y/D, într-un specimen direct sau în cazul în care TSM fenotipic indică TB-MDR, trebuie utilizată o metodă moleculară pentru testarea rezistenței la medicamentele de linia a doua pentru a ghida tratamentul și a reduce timpul de diagnosticare a TB-XDR. Testarea rezistenței *M. tuberculosis* la concentrații mai mari pentru RIF, ar putea fi considerată ca o opțiune pentru o combinație terapeutică în tratamentul pacienților cu TB MDR la care preparatele de linia 2 prezintă rezistență. Divergențele dintre rezistența fenotipică și rezultatele rezistenței genotipice pot fi interpretate cu anumite dificultăți, datorită studierii insuficiente a spectrului mutațiilor implicate în oferirea rezistenței *M. tuberculosis* către preparatele specifice. Pentru cazurile cu discrepanțe ale rezultatelor TS fenotipice și moleculare, trebuie să fie disponibile în plus infor-

mații despre nivelul de rezistență (rezistență joasă/ înaltă) și/sau genele și tipurile de mutații.

La etapa actuala metoda culturală TSA este încă necesară, pentru corectarea rezultatelor moleculare ale TSA, în special din specimene microscopic negative și pentru a detecta XDR-TB. Utilizarea metodelor moderne de analiză pe bază de soft-uri (TBeXiST), face posibilă o îmbunătățire a diagnosticului, astfel obținând rezultate semicantitative la testarea rezistenței *M.tb* către medicamente.

Concluzii

1. Corelarea rezultatelor testelor genotipice cu nivelul de rezistență fenotipică poate fi crucială în perspectiva unei abordări personalizate a tratamentului pacienților cu TB, oprirea răspândirii rezistenței la medicamente și promovarea utilizării optime a preparatelor disponibile pentru tratamentul TB rezistente.

2. Ori de câte ori testarea moleculară permite, rezultatele ar trebui să fie raportate cu mutațiile specifice detectate și cu descrierea implicațiilor clinice ale prezentei mutației.

3. Rezultatele studiului demonstrează, ca mai mult de 2/3 din pacienții cu rezistență la Moxifloxacina, la care sau depistat mutațiile genice care conferă o rezistență joasă, demonstrează sensibilitate la concentrații mai mari a preparatului, astfel acești pacienți și ar putea fi tratați cu aceste preparate în doze mari.

4. Depistarea mutației *rpoB*, codonul S531L și H526, indică la TB-MDR. Acești pacienți trebuie examinați prin metode moleculare pentru testarea rezistenței la medicamentele de linia a 2.

5. Depistarea mutației *rpoB*, codonul 516 demonstrează o rezistență joasă la RIF. Acești pacienți trebuie examinați prin metode culturale pentru estimarea nivelului de rezistență fenotipice.

Bibliografie

1. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis-- 5th ed. WHO/HTM/TB/2015.13
2. Sayera Banu, S. M. Mazidur Rahman, M. Siddiqur R. Khan, S.S.Ferdous, Shahriar Ahmed, Jean Gratz, Suzanne Stroup, Suporn Pholwat, Scott K. Heysell, Eric R. Houpt. *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, Volume 52 Number 1 jcm.asm.org
3. Salman Siddiqi, Mona Javaid, Potharaju Visalakshi Dewanand Mahto, Elvira Richter, Camilla Rodrigues, Jasmine Jani, Arora Jyoti, Radhika Mahatre, Altaf Ahmed, Sunil Asif, Digamber Behera, 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. DOI: 011. 10.1128/JCM.05188

4. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): policy statement. Geneva, Switzerland. WHO.2008.

5. 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.

6. Ardito F, et al.2001. *Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated*

system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 39:4440–4444.

7. 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 Rifampin and Isoniazid Resistances*. Journal of Clinical Microbiology. 2012, v. 50, nr. 4, 1264–1269. ISSN: 0095-1137.

8. 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*. Bulletin of the Academy of Science of Republic of Moldova, 4(36) 2012, ISSN 1857-0011.

9. Solima M. A. Sabeel, Mohamed Ahmed Salih, Manasik Ali, Salah-Eldin EL-Zaki Nadir Abuzeid, Zeinab

Abubaker Mohammed Elgadi, Hisham N. Altayb, Asrar M. A. Elegail, Nuha Y. Ibrahim, and Bahaeldin K. Elamin. *Phenotypic and Genotypic Analysis of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from Sudanese Patient Tuberculosis Research and Treatment*. V.2017, ID 8340746, 6 pages; <https://doi.org/10.1155/2017/8340746>

10. Garfein R. S., Catanzaro D. G. Rodwel T. C, Avalos E., R. L. Jackson, J. Kaping, H. Evasco, C. Rodrigues, V. Crudu, S-Y. G. Lin, E. Groessel, N. Hillery, A. Trollip, T. Ganiats, T. C. Victor, K. Eisenach, F. Valafar, J. Channick, L. Qian, A. Catanzaro. *Phenotypic and genotypic diversity in a multinational sample of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates*. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 04/2015; 19(4). DOI:10.5588/ijtld.14.0488

УДК: 616.24-002.5-089.8-078

<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2021.1-69.09>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В ОПЕРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ

Мария УРАКСИНА, Пётр РОГОЖКИН,
Екатерина ЕРЕМЕНКО, канд. мед. наук, доцент

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»
Минздрава России. г. Самара, Россия

e-mail: mmuraxina@gmail.com

Резюме

В настоящее время при улучшении эпидемических показателей по туберкулезу, количество больных с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза увеличивается, что усложняет и увеличивает сроки лечения таких пациентов. Целью работы является изучение лекарственной устойчивости (ЛУ) микобактерий туберкулеза, полученных из операционного материала. Материалы и методы: в исследование было включено 74 пациента с радикальными и диагностическими операциями на органах грудной клетки. Все пациенты были обследованы стандартными методами: микроскопия мокроты и БАЛЖ при бронхоскопии (при проведении), молекулярно-генетические методы, посев на плотные и жидкие питательные среды. Диагноз туберкулез был подтвержден морфологически у всех пациентов при гистологическом исследовании операционного материала. При анализе результатов лекарственной устойчивости обнаружено, что среди впервые выявленных больше половины пациентов (59,3%) имели множественную (44,6%) $p < 0,005$ и широкую лекарственную устойчивость (14,7%) $p = 0,003$, при этом у 74,5% ($n = 35/47$) до операции не были выявлены *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в мокроте. Представлена частота развития лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам первого и резервного ряда, структура лекарственной устойчивости в зависимости от группы диспансерного учета. Выполнен сравнительный анализ тестов лекарственной чувствительности (ТЛЧ МБТ), выделенных из мокроты до операции и из операционного материала. Результаты исследования показали высокий процент лекарственной устойчивости МБТ, полученных в операционном материале у пациентов с отрицательными анализами на МБТ. Более половины пациентов, не получающих антибактериальной терапии до операции, имеет МЛУ и ШЛУ, что предполагает высокую региональную первичную лекарственную устойчивость микобактерий туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, лекарственная устойчивость, микобактерия туберкулеза, операционный материал.