

# Aplicaciones de la secuenciación del genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis* para la predicción de resistencias a antibióticos en muestras de Mozambique

Carla Mariner-Llicer<sup>1</sup>, Belén Saavedra Cervera<sup>2,3</sup>, Edson Mambuque<sup>3</sup>, Neide Gomes<sup>3</sup>, Shilzia Mungambe<sup>3</sup>, Luis Villamayor<sup>4</sup>, Irving Cancino-Muñoz<sup>4,5</sup>, Manuela Torres-Puente<sup>1</sup>, Dinis Nguenha<sup>3,6</sup>, Durval Respeito<sup>3</sup>, Gustavo Tembe<sup>3</sup>, Mariana G. López<sup>1</sup>, Iñaki Comas<sup>1,7</sup>, Alberto L. García-Basteiro<sup>2,3,8</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia CSIC, Valencia, Spain. <sup>2</sup>ISGlobal, Hospital Clínic – Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM), Maputo, Mozambique. <sup>4</sup>FISABIO Public Health, Valencia, Spain. <sup>5</sup>I2SysBio, Universitat de València CSIC, Valencia, Spain. <sup>6</sup>Amsterdam Institute for Global Health & Development (AIGHD), Amsterdam, The Netherlands. <sup>7</sup>CIBER in Epidemiology and Public Health, Madrid, Spain. <sup>8</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Barcelona, Spain.

## Correspondencia:

Carla Mariner

E-mail: cmariner@ibv.csic.es

## Introducción

La tuberculosis (TB) sigue siendo un problema para la salud global debido al aumento de la incidencia de casos con resistencias a antibióticos. Tener técnicas de diagnóstico rápidas podría ser una buena estrategia para mejorar el control de casos resistentes. La técnica de referencia para la detección de casos resistentes es el test fenotípico de sensibilidad a antibióticos (DST). Esta prueba tiene como limitación el tiempo. El lento crecimiento de las micobacterias puede retrasar el diagnóstico hasta un mes, tiempo durante el que el paciente puede que no esté recibiendo el tratamiento más óptimo. En algunos países de alta carga de la enfermedad ya se están utilizando de forma rutinaria tests moleculares como el GeneXpert Ultra, que aparte de ser muy sensible para detectar *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), también detecta mutaciones conocidas que confieren resistencia a rifampicina (RIF). Estas pruebas diagnósticas se realizan a partir de muestras de esputo y son muy rápidas, pero evalúan un reducido espectro de mutaciones de resistencia, por lo que cepas resistentes con mutaciones poco comunes pueden escapar a ellos. Una buena alternativa es la secuenciación genómica (WGS) de MTB que no solo se está utilizando en investigación, sino que ya está siendo aplicada en sistemas de vigilancia de la enfermedad en países como Holanda o Reino Unido<sup>1</sup>. Esta herramienta permite establecer links epidemiológicos para estudiar la transmisión de la enfermedad y detectar mutaciones de resistencia conocidas o potenciales candidatas, información que podría ser utilizada para dar un tratamiento personalizado a los pacientes. Actualmente, incluye un paso de cultivo para obtener suficiente biomasa para la secuenciación, pero se desconoce si

supone un cuello de botella para la diversidad poblacional de la muestra diagnóstica y cómo puede afectar a la predicción de resistencias o a la inferencia epidemiológica. Por ello, en la última década ha habido un interés común en desarrollar técnicas de secuenciación directa a partir de muestras complejas como los esputos. La mayoría se han centrado en el diagnóstico y detección de mutaciones de resistencia, pocos han obtenido suficiente calidad como para evaluar la diversidad genética entre la muestra diagnóstica y su cultivo sacando conclusiones contradictorias por la falta de estandarización de protocolos<sup>2,3</sup>.

## Estudio 1: secuenciación de muestras diagnósticas y sus cultivos para comparar la diversidad genómica y ver cómo afecta a la predicción de resistencias

Uno de los objetivos era evaluar si el cultivo representa un cuello de botella en la diversidad genética que suponga un sesgo a la hora de obtener los resultados de la secuenciación por el hecho de que se pierdan aquellas poblaciones bacterianas que están menos adaptadas a crecer in vitro. Para ello se compararon 61 pares de esputos y cultivos. Para obtener suficiente ADN de MTB para secuenciar, se llevaron a cabo técnicas de enriquecimiento de los esputos. Se utilizó un protocolo de extracción de ADN basado en una lisis diferencial, para eliminar ADN contaminante. Se evaluó la cantidad de ADN de MTB con una qPCR (marcador específico Rv2341) y en aquellos esputos que presentaban menos de 200 copias genómicas se realizó un paso de captura de ADN de MTBC con sondas de ARN previo a la secuenciación. En total se capturaron 16 y se secuenciaron

45 esputos directos. En el análisis de todas las muestras, se clasificaron taxonómicamente las lecturas para descartar aquellas procedentes de humano y otros microorganismos. Las lecturas de MTB se mapearon contra el genoma de referencia y se realizó el llamado de variantes. Se evaluaron las fuentes de introducción de falsa variabilidad, descartando las variantes procedentes de errores de mapeado, genes conservados y familias génicas repetitivas. Tras comparar las variantes de alta confianza entre las muestras emparejadas se obtuvo una alta concordancia: 64% de las parejas no presentaban diferencias, el 28% presentaba de 1 a 5 mutaciones discrepantes en esputo y solo el 8% presentaba más de 5 mutaciones discrepantes. En cualquier caso, no se obtuvo ninguna mutación fijada discrepante. La concordancia fue del 100% en la predicción de resistencias y de linaje. Estos resultados sugieren que el cultivo representa la diversidad poblacional presente en el esputo, por tanto, para investigación, se puede secuenciar el cultivo, cuando el tiempo no sea un factor limitante, o el esputo para recuperar aquellas cepas que no crezcan in vitro. En el caso del diagnóstico, actualmente, la WGS de MTB directa de esputo requiere optimización a nivel computacional y económico para usarse en vigilancia.

## Estudio 2: aplicación de la secuenciación de muestras del sur de Mozambique para detectar mutaciones asociadas a resistencia que escapan al GeneXpert Ultra

El segundo objetivo era aplicar la WGS para evaluar las mutaciones asociadas a resistencia a antibióticos de las cepas de MTB que circulan por el sur de Mozambique. En el sur de África la monitorización de resistencia a RIF supone un desafío debido a la propagación de un clon de TB multirresistente (MDR) con una mutación de resistencia a RIF de bajo nivel, *rpoB*\_I4941F, que tampoco es detectada por el DST fenotípico ya que dificulta el crecimiento de la bacteria. Esta cepa generó un brote en Eswatini en el 2009 y luego en 2013 pasó a Sudáfrica<sup>4</sup>. En Mozambique, la última encuesta de vigilancia de resistencia a antibióticos se publicó en 2014 y las cifras estables, respecto a las encuestas anteriores, indican que se podría estar infraestimando la prevalencia de casos MDR (3.8% casos nuevos, 13% casos retratados). Para evaluar si esto se debe a la presencia de mutaciones de

resistencia que escapan a los tests diagnósticos, se analizaron dos conjuntos de secuencias de muestras de pacientes con TB procedentes de dos estudios realizados en la provincia de Manhiça, al sur de Mozambique. El primero era del 2013-2014 y presentaba 275 muestras<sup>5</sup>; y el segundo del 2018 contenía 337 muestras (no publicado). Se encontraron mutaciones RIF-R no incluidas en el Gene Xpert Ultra en tres cepas, la *rpoB*\_I491F en un caso de 2014, no relacionado con el brote de Eswatini; y la *rpoB*\_V170F en dos cepas del 2018. A pesar de no encontrar evidencia de propagación de la cepa MDR de Eswatini, sí que encontró transmisión transfronteriza después de analizar 10.000 secuencias procedentes de 30 países africanos. Además, se detectó un aumento de casos nuevos resistentes a isoniacida no MDR (7.6%) suponiendo un nuevo reto para el control de la TB. Estos resultados sugieren que aunque solo se hayan detectado mutaciones poco comunes en tres cepas de la región de Manhiça, como escapan de las técnicas diagnósticas actuales y hay una alta transmisión entre provincias, se podrían provocar brotes. Por tanto, el diseño de nuevos test moleculares o la combinación de estos con la secuenciación genómica podría ser la clave para detectar a tiempo cepas resistentes y dar a los pacientes tratamientos efectivos desde el primer momento para frenar la transmisión.

## Bibliografía

1. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, *et al.* Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis: current standards and open issues. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:533-45.
2. Votintseva AA, Bradley P, Pankhurst L, Del Ojo Elias C, Loose M, Nilgiriwala K, *et al.* Same-Day Diagnostic and Surveillance Data for Tuberculosis via Whole-Genome Sequencing of Direct Respiratory Samples. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1285-98.
3. Shockey AC, Dabney J, Pepperell CS. Effects of Host, Sample, and in vitro Culture on Genomic Diversity of Pathogenic Mycobacteria. *Front Genet.* 2019;10:477.
4. Beckert P, Sanchez-Padilla E, Merker M, Dreyer V, Kohl TA, Utpatel C, *et al.* MDR M. tuberculosis outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era. *Genome Med.* 2020;12:104.
5. Saavedra Cervera B, López MG, Chiner-Oms Á, García AM, Cancino-Muñoz I, Torres-Puente M, *et al.* Fine-grain population structure and transmission patterns of Mycobacterium tuberculosis in southern Mozambique, a high TB/HIV burden area. *Microb Genom.* 2022;8. doi:10.1099/mgen.0.000844