

‘Whole genome sequencing’ van *Mycobacterium tuberculosis* complexisolaten

Dick van Soolingen, Tridia van der Laan, Rina de Zwaan, Miranda Kamst, Arnout Mulder, Han de Neeling, Richard Anthony, Rana Jajou

Samenvatting

All e *Mycobacterium tuberculosis* complexisolaten (MTBC-isolaten) die vanuit ongeveer 30 laboratoria in Nederland naar het nationale Tuberculose Referentie Laboratorium van het RIVM worden opgestuurd, zijn vanaf begin 2016 prospectief aan ‘whole genome sequencing’ (WGS) onderworpen, en wel voor drie doeleinden: 1) epidemiologische typering, 2) het bepalen van de gevoeligheid voor eerstelijnsmiddelen en 3) (sub)species en genotype-identificatie. Over het gebruik van WGS als epidemiologische marker is al diverse keren gerapporteerd en deze toepassing is vanaf 2019 de standaard bij het RIVM. Met WGS kan ook de gevoeligheid van *M. tuberculosis* voor de vier eerstelijnsmiddelen dermate nauwkeurig worden vastgesteld, dat de klassieke *in vitro*-resistentiebepaling nog maar voor ongeveer 10 procent van de kweken in ons land uitgevoerd hoeft te worden. In dit artikel worden onze resultaten (die recent in een ander tijdschrift zijn gepubliceerd) samengevat en de consequenties voor de diagnostiek van tuberculose (tbc) in Nederland beschreven.

Summary

All *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) isolates, which are sent from about 30 laboratories in the Netherlands to the national tuberculosis reference laboratory at the RIVM, are from early 2016 on prospectively subjected to Whole Genome Sequencing (WGS) for three purposes; 1) epidemiological typing, 2) to determine the susceptibility to first line drugs and 3) for (sub) species and genotype identification. About the use of WGS as an epidemiological marker several reports have been published and this application is since 2019 the standard at the RIVM. With WGS, also the susceptibility of *M. tuberculosis* to the four first line drugs can be determined more

accurately, in which classical *in vitro* drug susceptibility testing remains necessary to be performed in only 10 percent of the cultures in our country. This article is meant to summarize our findings (recently published in another journal) and to describe the consequences for the diagnosis of tuberculosis (tbc) in the Netherlands.

Inleiding

Reguliere tbc-patiënten worden langdurig (zes maanden) behandeld met de vier antituberculosemiddelen isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide. In Nederland wordt echter bij ongeveer 10 procent van de MTBC-isolaten een vorm van resistentie waargenomen tegen een of meer antibiotica. Bij resistentie tegen ten minste isoniazide en rifampicine is er sprake van ‘multidrugresistente’ tuberculose (MDR-TB) en worden de betreffende patiënten doorverwezen naar een van de twee gespecialiseerde tuberculosecentra in Nederland voor behandeling van speciale tbc-gevallen; Beatrixoord in Haren of Dekkerswald in Nijmegen. Dit betreft tussen de 5 en 15 gevallen per jaar en deze vergen een behandeling tot wel twee jaren met tweedeelijnsmiddelen, waarbij resistentie tegen deze middelen bij het RIVM met een WHO-geaccrediteerde wijze wordt bepaald. Resistentie tegen antibiotica wordt van oudsher *in vitro* getest door de bacteriële isolaten, in of op een groeimedium te brengen waarin zich een

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Tuberculose Referentie Laboratorium Bilthoven, D. van Soolingen, hoofd laboratorium, T. van der Laan, analist, R. de Zwaan, analist, M. Kamst, hoofdanalist, A. Mulder, analist, H. de Neeling, bio-informaticus, R. Anthony, wetenschappelijk medewerker, R. Jajou, promovenda RIVM. Contactadres: D. van Soolingen (dick.van.soolingen@rivm.nl).

kritische concentratie (breekpunt) bevindt van het betreffende middel, waarna men kan aflezen of de bacteriën in aanwezigheid van deze concentratie antibioticum nog kunnen groeien. In sommige bepalingen kan de groei automatisch waargenomen worden, zoals in de Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT)-methode, die momenteel de internationale referentiestandaard is. Indien er sprake is van groei bij de kritische concentratie van een antibioticum spreekt men van resistentie. Deze fenotypische methode is, zeker in het geval van de zeer langzaam groeiende mycobacteriën, zeer tijdrovend en vraagt om veel vakmanschap voor het leveren van betrouwbare uitslagen onder strikte kwaliteitsnormen. De accuratesse van resistentiebepalingen wordt ook negatief beïnvloed door het feit dat bij sommige antibiotica, zoals ethambutol, het kritische breekpunt dicht bij de minimaal remmende concentratie (MRC) ligt. Bij laagresistente isolaten zou in feite een concentratie net onder het breekpunt getest moeten worden, omdat de standaard MGIT-bepaling foutgevoelige resultaten laat zien. Daarnaast is de reproduceerbaarheid van de MGIT, zoals in het geval van pyrazinamide, niet optimaal omdat er speciale groeiomstandigheden nodig zijn om deze test uit te kunnen voeren.

In de laatste decennia zijn er moleculaire testen ontwikkeld om mutaties die ten grondslag liggen aan resistentie direct na de diagnose aan te tonen. Hierdoor kan de therapie vroegtijdig worden bijgesteld en ook MDR-TB zo snel mogelijk worden gediagnosticeerd. Het ene antibioticum leent zich echter beter voor een moleculaire test dan het andere. Bij rifampicine bijvoorbeeld bevinden vrijwel alle mutaties die ten grondslag liggen aan resistentie zich in (of in de omgeving van) één gen: het *rpoB*-gen. Bovendien hebben de meeste mutaties een hoge positief voorspellende waarde, omdat het grootste deel van de rifampicine-resistentie wordt veroorzaakt door een beperkt aantal bekende mutaties. De variatie bij isoniazide-resistentie is iets groter (mutaties in *katG*-, *inhA*-, *fabG1*-, *ahpC*-gen), maar ook hanteerbaar. Daarentegen is het resistentiemechanisme bij andere antibiotica minder uniform en zijn de voorspellende waarden van moleculaire testen lager.

Veel moleculaire testen, zoals de Reverse Line Blot technologie (Hain, Nehren, Duitsland),

hebben voor isoniazide en rifampicine een hoge positief voorspellende waarde. De negatief voorspellende waarde is iets moeilijker in te schatten omdat uitsluitend bepaalde, bekende mutaties gedetecteerd worden. Met WGS worden alle resistentiegenen die we kennen onderzocht op verschillende typen mutaties zoals single nucleotide polymorfismen (SNP's), inserties of deleties. Deze benadering leent zich dus per definitie beter om een test te ontwikkelen voor het nauwkeurig voorspellen van zowel gevoeligheid als resistentie.

De Oxford Universiteit in Engeland heeft in 2018 een grote internationale studie geïnitieerd om de negatief voorspellende waarde van WGS voor de vier eerste lijnmiddelen om tbc te behandelen vast te stellen bij een grote collectie MTBC-isolaten. Nederland heeft hieraan deelgenomen en ongeveer 600 (uit 2016 afkomstige) genomesequenties aangeleverd, van de meer dan 10.000 die in deze studie werden geanalyseerd.¹ In deze studie werd tevens gekeken naar de positief voorspellende waarde van resistentiemutaties; die bleek hoog, maar sterk variërend per mutatie. Dit sluit aan bij wat er in een recent (2018) rapport van de WHO over het gebruik van WGS voor het voorspellen van resistentie is geconcludeerd.² Om nog meer zekerheid te verkrijgen over de negatief voorspellende waarde van WGS voor gevoeligheid voor eerstelijnsmiddelen, werd bij het RIVM een aanvullende, nog meer gedetailleerde studie uitgevoerd voor alle MTBC-isolaten uit 2016 en 2017.³

De 10.000 genomen (10K) studie van de Oxford Universiteit in Engeland

Bij de Oxford Universiteit werd de voorspellende waarde van WGS onderzocht voor het vaststellen van de gevoeligheid van *Mycobacterium tuberculosis* voor eerstelijnsantibiotica. Hierbij werden de gedetecteerde mutaties in de negen belangrijkste resistentiegenen vergeleken met de uitkomsten van verschillende fenotypische resistentiebepalingen, zoals MGIT, 7H10 of Löwenstein-Jensen-agar, of microscopic observation drug-susceptibility (MODS) assays.¹ De studie betrof in totaal 10.209 sequenties van MTBC-isolaten vanuit zestien landen van zes continenten. Zowel WGS als de fenotypische resistentiebepalingen

werden in de deelnemende laboratoria uitgevoerd. De gevoeligheid voor isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide werd correct voorspeld met een specificiteit van respectievelijk 99,0, 98,8, 93,6 en 96,8 procent. In vier landen (Duitsland, Italië, Engeland en Nederland) met een lage prevalentie van tbc en waar WHO-geaccrediteerde resistentiebepalingen routinematig worden toegepast, bedroeg de negatief voorspellende waarde voor het aantonen van gevoeligheid voor isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide, respectievelijk 98,6, 99,0, 98,8 en 98,7 procent.¹ In deze publicatie van het CRyPTIC-consortium werd geconcludeerd dat WGS een betrouwbare voorspeller is van gevoeligheid voor de vier eerstelijnsmiddelen om tbc te behandelen. Ook de positief voorspellende waarden waren hoog voor de vier eerstelijnsmiddelen; de resistentie tegen isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide werd correct aangetoond met respectievelijk een sensitiviteit van 97,1, 97,5, 94,6 en 91,3 procent.

De discrepantiestudie van het RIVM

Hoewel de uitkomsten van de Oxfordstudie op zich al voldoende waren om WGS als betrouwbaar te bestempelen voor het voorspellen van gevoeligheid voor de vier eerstelijnsmiddelen, werd in Nederland een aanvullende studie gedaan om de discrepanties tussen de uitkomsten van de fenotypische resistentiebepalingen en de bevindingen in WGS verder uit te zoeken.³ Alle MTBC-isolaten die bij het RIVM-referentielaboratorium werden ontvangen in 2016 en 2017 werden geïncubeerd in de discrepantiestudie. Negen genen en/of de promotorregio's werden onderzocht op verschillende soorten mutaties (SNP's en inserties of deleties) die geassocieerd zijn met resistentie: het *rpoB*-, *katG*-, *fabG1*-, *ahpC*-, *inhA*-, *embA*-, *embB*-, *pncA*- en *rpsA*-gen. Isolaten die discrepant waren in de MGIT/WGS-resultaten, werden opnieuw getest in de MGIT met de normaal gebruikte kritische concentratie, een lagere concentratie (net onder het breekpunt) en onder langere incubatie in de MGIT. De laatste twee wijzigingen werden toegepast voor de detectie van een laag niveau van resistentie. Daarnaast werd een controlegroep, bestaande uit isolaten uit 2016/2017 die eerder concordant waren in de MGIT/WGS-resultaten, ook opnieuw getest in de MGIT op dezelfde

Tabel 1. Resistentieprofielen van de 1121 *M. tuberculosis* complexisolaten uit de Nederlandse studie.

Gevoeligheidsbepaling met MGIT	n (%)
Gevoelig voor alle vier de middelen	997 (88,9%)
Isoniazide mono-resistent	68 (6,1%)
Pyrazinamide mono-resistent	30 (2,7%)
Rifampicine mono-resistent	2 (0,2%)
Ethambutol mono-resistent	0 (0%)
Isoniazide + pyrazinamide-resistent	1 (0,1%)
MDR-TB	23 (2%)
Totaal	1121 (100%)

MGIT = Mycobacteria Growth Indicator Tube; MDR-TB = multi-drugresistente tbc.

manier als hierboven is beschreven. In totaal werden voor deze studie 1121 MTBC uit Nederland geïncubeerd, waarvan ongeveer 11 procent resistent was tegen een of meer middelen (zie tabel 1).

In totaal werden 26 isolaten met overeenkomstige MGIT-/WGS-resultaten geïncubeerd als controlegroep; bij allemaal waren de MGIT-resultaten voor isoniazide, rifampicine en ethambutol in de herhaaltsten opnieuw in overeenstemming met de WGS-resultaten. Voor pyrazinamide vertoonden veel isolaten die eerst gevoelig waren in de MGIT én WGS, bacteriële groei bij de lagere concentratie en na langere incubatie in de MGIT. De interpretatie van deze alternatieve afkappwaarden wordt dus als niet betrouwbaar beschouwd voor de detectie van een laag resistentieniveau.

Tabel 2. Voorspellende waarden van WGS ten opzichte van de MGIT-referentiestandaard en de samengestelde referentiestandaard voor de 1121 *M. tuberculosis* complexisolaten.

	MGIT-referentiestandaard				Samengestelde referentiestandaard			
	Sensitiviteit	Specificiteit	PVW	NVW	Sensitiviteit	Specificiteit	PVW	NVW
Rifampicine	100%	99,2%	73,5%	100%	96,9%	99,7%	91,2%	99,9%
Isoniazide	97,8%	99,2%	91,9%	99,8%	98%	99,9%	99%	99,8%
Ethambutol	80%	98,6%	20%	99,9%	94,1%	99,6%	80%	99,9%
Pyrazinamide	85,1%	98,8%	75,5%	99,3%	-	-	-	-

PVW = positief voorspellende waarde; NVW = negatief voorspellende waarde.

Van de 1121 isolaten bleken 57 isolaten (5,1 procent) in totaal 63 resultaten te vertonen die discrepant waren in de initiële MGIT-bepalingen ten opzichte van de WGS; vijf isolaten waren discrepant voor diverse middelen en de overige 52 isolaten voor één middel. In de discrepantieanalyse konden in totaal 53/63 discrepanties opnieuw getest worden; bij de overige 10 discrepanties (van in totaal 9 isolaten) vertoonden de betreffende isolaten geen groei vanuit de -70°C diepvries. De discrepanties bestonden voornamelijk uit MGIT-gevoelige isolaten die een resistentiemutatie vertoonden.

De discrepantieanalyse gaf aan dat van de 53 opnieuw geteste discrepanties:

- 25 verklaard konden worden vanuit fout-negatieve bevindingen in de MGIT. Dit betrof gevallen van een laag niveau van resistentie, waarbij er in eerste instantie geen groei optrad bij de kritische concentratie maar wel bij een concentratie net onder het breekpunt of bij langere incubatie.
- 9 bij het normale kritische breekpunt concordant werden in de herhaling met de resultaten in WGS.

- 3 resistent waren tegen isoniazide in de MGIT, waarbij ook een resistentiemutatie werd aangetoond met WGS, maar een andere dan de meest voorkomende *katG_S315T*.
- 9 discrepant bleven voor pyrazinamide.

- 7 discrepant bleven voor isoniazide, rifampicine of ethambutol, waarvan:
 - één isolaat laagresistent voor isoniazide bleef in de MGIT (ook bij het hertesten), maar gevoelig was in de WGS.
 - één isolaat eerst hoogresistent voor ethambutol was in de MGIT, maar bij het hertesten bacteriële groei liet zien bij langere incubatie bij de lagere concentratie; dit isolaat was gevoelig in de WGS.
 - drie isolaten gevoelig waren voor rifampicine in de MGIT (ook bij het hertesten), maar een *rpoB_D435G*-, *rpoB_D545E*- of *rpoB_L430P*-mutatie hadden. De *rpoB_D435G*- en *rpoB_D545E*-mutaties worden in een recent WHO-rapport gerapporteerd als high-confidence mutaties, maar de bijbehorende MRC-waarden ontbreken. De *rpoB_L430P*-mutatie wordt in het WHO-rapport gerapporteerd als minimal-confidence mutatie met een lage MRC-waarde (nog lager dan de geteste waarde in onze discrepantie analyse).
 - twee isolaten gevoelig waren voor ethambutol in de MGIT (ook bij het hertesten), maar een *embB_M306I*- of *embB_G406A*-mutatie hadden in de WGS-analyse.

De negatief voorspellende waarde van WGS ten opzichte van de MGIT was in deze studie 99,8, 100, 99,9 en 99,3 procent voor isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide, respectievelijk (zie tabel 2).

De voorspellende waarden van WGS werden ook vergeleken met een zogeheten 'samengestelde referentiestandaard'. Isolaten met mutaties waarvan bekend is dat deze geassocieerd zijn met (lage) resistentie tegen rifampicine, isoniazide en ethambutol en die vaak als gevoelig worden gerapporteerd in de MGIT, maar die een verhoogde MRC lieten zien bij het hertesten, werden als resistent gerapporteerd in de samengestelde referentiestandaard. De positief voorspellende waarde van WGS ten opzichte van de samengestelde referentiestandaard steeg daarop aanzienlijk naar 91,2, 99 en 80 voor rifampicine, isoniazide en ethambutol respectievelijk (zie tabel 2), hetgeen de tekortkomingen van de MGIT als referentiestandaard weergeeft voor het detecteren van laag-resistente isolaten.

Conclusies

Zonder analyse van discrepante resultaten waren de negatief voorspellende waarden van WGS voor het aantonen van de gevoeligheid voor eerstelijnsmiddelen voor behandeling van tbc al zo hoog in de Oxfordstudie, dat WGS als exclusieve parameter ingezet kan worden om gevoeligheid vast te stellen. De negatief voorspellende waarde op grond van de vergelijking van de MGIT en WGS voor isolaten uit Nederland viel nog gunstiger uit en benaderde de 100 procent voor alle vier de eerstelijnsmiddelen. Na de discrepantie-analyse bleek tevens de positief voorspellende waarde van WGS dermate hoog te zijn (80 procent en hoger), dat WGS ook een betrouwbaar instrument is om resistentie te voorspellen.

De MGIT blijkt vooral bij een laag niveau van resistentie tegen isoniazide, rifampicine en ethambutol soms een fout-negatieve uitslag te geven wat betreft resistentie, zoals aangetoond onder aangepaste condities. Voor pyrazinamide is het internationaal bekend en aanvaard dat de fenotypische resistentiebepaling het minst betrouwbaar is voor de eerstelijnsmiddelen; de WHO beveelt zelfs aan om deze test te negeren. Onze discrepantieanalyse heeft dit opnieuw bevestigd.

Bij het vinden van mutaties in de bekende resistentiegenen kan de voorspellende waarde afgeleid worden uit de database van het RIVM (associatie resistentiemutaties en fenotypische resistentie), de internationale ReseqTB-database en een recent WHO-rapport² waarin high confidence, moderate confidence en low confidence mutaties zijn onderscheiden. Ook de internationale literatuur kan echter helpen om de voorspellende waarden te bepalen. De voorspellende waarden van mutaties voor resistentie wisselen sterk per type mutatie. Voorlopig zijn deze waarden nog niet gefixeerd en dient het bewijs uit diverse bronnen gecombineerd te worden om de resistentie te voorspellen met de daarbij behorende onzekerheid en vermelding daarvan. Tevens is internationaal onderzoek gaande naar de rol van resistente minderheidspopulaties in de kweken. Het verdient aanbeveling om de bepaling van de voorspellende waarde van resistentiemutaties door het tbc referentielaboratorium te laten uitvoeren/verifiëren.

WGS kan op een betrouwbare wijze ingezet worden om te screenen op de gevoeligheid van MTBC-isolaten voor de vier eerstelijnsmiddelen isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide. Bij afwezigheid van mutaties in de negen belangrijkste resistentiegenen hoeft dan geen fenotypische resistentiebepaling meer gebruikt te worden om resistentie te detecteren. Bij het vinden van mutaties in de negen resistentiegenen (ongeveer 10 procent van de isolaten in Nederland) is het verstandig om voorlopig uitgebreide fenotypische resistentiebepalingen met verschillende MRC's in te blijven zetten om het resistentieprofiel nauwkeurig in kaart te brengen en eventueel extra middelen te testen. Ook blijft het mogelijk voor behandelaars om op grond van de anamnese, het beloop van de behandeling of het klinische beeld, de fenotypische resistentiebepaling te blijven aanvragen bij het RIVM. Uiteindelijk is het van belang om de behandeluitkomsten te toetsen aan deze nieuwe vorm van resistentiebepalingen, maar voor dit moment kan geconcludeerd worden dat WGS een betrouwbaarder voorspeller is van de gevoeligheid voor de eerstelijnsmiddelen om tuberculose te behandelen dan de MGIT-bepaling.

Referenties

1. The CRyPTIC Consortium. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *N Engl J Med.* 2018;379:1403-15.
2. WHO-rapport. WHO reference number: WHO/CDS/TB/2018.19. (https://www.who.int/tb/areas-of-work/laboratory/policy_statements/en/).
3. Jajou R, van der Laan T, de Zwaan CC, et al. Whole genome sequencing more accurately predicts susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs than phenotypic testing. *J Antimicrob Chemother.* 2019: : pii: dkz215. doi: 10.1093/jac/dkz215.