

UN DESAFÍO TERAPÉUTICO: LA HETERORRESISTENCIA EN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

ANA GAMBERALE¹, BRUNO BARTOLETTI¹, VÍCTOR CRUZ¹, MARIO MATTEO², CECILIA LATINI²,
ROXANA PAUL³, FEDERICO LORENZO³, NORBERTO SÍMBOLI³, DOMINGO PALMERO^{1,4}

¹División Tisioneumonología, Hospital Dr. F. J. Muñoz, ²Laboratorio de Micobacterias
Dr. Abel Cetrángolo, Instituto Vaccarezza, ³Servicio de Micobacterias,
INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, ⁴Instituto de Tisioneumonología Prof. Dr. R. Vaccarezza,
Buenos Aires, Argentina

Dirección postal: Domingo Palmero, Instituto Prof. Dr. R. Vaccarezza (UBA), Av. Vélez Sarsfield 405, 1282 Buenos Aires, Argentina

E-mail: djpalmero@vaccarezza.fmed.uba.ar

Recibido: 14-VIII-2023

Aceptado: 19-IX-2023

Resumen

Se considera infección mixta por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) a la coexistencia en forma simultánea y en un mismo paciente de 2 cepas diferentes de Mtb o 2 variantes distintas de la misma cepa. Cuando una de las variantes selecciona mutaciones de resistencia, se denomina heterorresistencia (HTR) monoclonal; en caso de que sean 2 cepas diferentes, una sensible y una resistente (o cepas con diferentes patrones de resistencia), se denomina HTR policlonal. Se presentan 3 pacientes, HIV/sida, todos con reiterados problemas de adherencia al tratamiento, en los cuales a través de la secuenciación genómica completa de Mtb se diagnosticó HTR monoclonal con coexistencia de 2 variantes de la misma cepa aisladas de muestras de pulmón y ganglios linfáticos, con diferentes perfiles de resistencia en cada uno de los casos. Es importante pensar en la posibilidad de HTR, principalmente en pacientes con múltiples intentos terapéuticos previos y altas poblaciones bacilares, como en el sida avanzado, dado que esta situación compromete potencialmente los resultados del tratamiento al coexistir cepas o variantes de cepas sensibles y resistentes.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, drogorresistencia, heterorresistencia, tuberculosis

Abstract

An emerging problem: heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis

Mixed infection by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) consists in the simultaneous coexistence in the same patient of two different strains of Mtb or 2 different variants of the same strain. When one of the variants selects for resistance mutations, it is called monoclonal heteroresistance (HTR); if there are 2 different strains, one sensitive and one resistant (or with different resistance patterns), it is called polyclonal HTR. Three cases of HIV/AIDS patients are presented, all with repeated treatment adherence problems, in whom monoclonal HTR was diagnosed through Mtb complete genomic sequentiation with the coexistence of two variants of the same strain isolated from samples from lung and lymph nodes, with different resistance profiles in each case. It is important to consider the possibility of HTR, especially in patients with multiple previous therapeutic attempts and high bacillary populations, such as in advanced AIDS, since this situation potentially compromises treatment results by coexisting sensitive and resistant variants of a strain (or strains).

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, heteroresistance, tuberculosis

Se considera infección mixta por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) a la coexistencia en forma simultánea y en un mismo paciente de 2 cepas diferentes de *Mtb* o 2 variantes distintas de la misma cepa. Cuando una de las variantes selecciona mutaciones de resistencia, se denomina heterorresistencia (HTR) monoclonal; en caso de que sean 2 cepas diferentes, una sensible y una resistente, se denomina HTR policlonal¹⁻³.

La resistencia en *Mtb* es cromosómica, existen mutantes naturalmente resistentes, de muy baja frecuencia, que son seleccionadas por tratamientos inadecuados relacionados con una monoterapia real o encubierta. Un paciente puede presentar TB drogorresistente (TB-DR) a uno o más fármacos por este mecanismo o por infección a partir de un caso previamente resistente. La TB-DR incluye desde la monorresistencia (a un solo fármaco) a la multirresistencia (TB-MDR: a isoniacida [H] y rifampicina [R] como mínimo)^{1,2}.

En este reporte, se presentan tres casos de pacientes viviendo con HIV/sida, todos con reiterados problemas de adherencia al tratamiento, en los cuales a través de la secuenciación genómica completa (SGC) de *Mtb* se diagnosticó HTR con coexistencia de 2 variantes de la misma cepa aisladas de muestras de diferentes órganos (pulmón y ganglio en 2 casos y distintos ganglios en el otro) con diferentes perfiles de resistencia en cada uno de los casos. Para realizar la SGC se extrajo el ADN de los aislamientos según un protocolo estándar para micobacterias⁴. Las librerías genómicas se prepararon utilizando el kit Nextera® XT (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas individuales se indexaron con el kit Nextera® XT. Las lecturas de las secuencias de todos los aislamientos se obtuvieron utilizando la plataforma Illumina MiSeq. Para el análisis se tomó como referencia la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y los algoritmos de análisis empleados fueron mykrobe v0.10.0 y TB-Profler v4.4.2.

Caso clínico 1

Hombre de 29 años, HIV de transmisión vertical, CD4⁺=98 céls/ μ L, consumo problemático de sustancias ilícitas, sin adherencia al tratamiento antirretroviral (TARV), derivado de otra institución en noviembre de 2022 con diagnóstico de tuberculosis (TB) diseminada, incluyendo

meningitis, con resistencia a R detectada por Xpert®MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, USA) en muestra de aspirado ganglionar (mutación L452P en el gen *rpoB*), con cultivo en MGIT-960 (BACTEC *Mycobacteria Growth Indicator Tube* 960, Becton-Dickinson), posteriormente sensible a H y al resto de los fármacos. En el esputo de ingreso hospitalario (en el mismo mes), el cultivo en MGIT 960 muestra sensibilidad a H y R.

Debido a la discordancia entre los resultados de ambas muestras se solicitó SGC, que demostró que ambos aislamientos pertenecen a una única cepa con una distancia entre los aislamientos de 0 SNPs (de sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphisms*).

Se agregaron 2 fármacos, R (considerando la variante sensible a H y R) y clofazimina (Cfz) como complemento de la terapia inicial de la variante resistente a R [H, linezolid (Lzd), levofloxacina (Lfx), etambutol (E), pirazinamida (Z)], posteriormente se suspendió el E para simplificar la toma de la medicación y por su baja actividad anti-TB. A la fecha continúa tratamiento a través de una ONG con sede cercana a su domicilio.

Caso clínico 2

Hombre de 18 años, HIV de transmisión vertical, consumo problemático de sustancias ilícitas, CD4⁺=7 céls/ μ L, TB diagnosticada en 2016 en otra institución, con pobre adherencia al tratamiento estándar, en febrero de 2019 presentó TB diseminada, con compromiso pulmonar, ganglionar, absceso de psoas y meningitis. El Xpert®MTB/RIF de una punción ganglionar detectó complejo *Mtb* resistente a R (mutación H445D en el gen *rpoB*); posteriormente el aislamiento resultó sensible a H por MGIT 960. Es derivado al Hospital Muñiz y en su ingreso (marzo de 2019), el esputo procesado por método molecular rápido fue positivo para complejo *Mtb*, sensible a R (el MGIT 960 resultó también sensible a R e H). El tratamiento inicial fue: H, cicloserina (Cs), etionamida (Eto), Lfx y Z (presentaba leucopenia que impidió administrar Lzd). Al conocer los resultados discordantes, se añadió al esquema rifabutina (en lugar de R por interacción con el TARV) y Cfz. Terminó el tratamiento en otra institución, supervisado, y fue dado de alta en octubre de 2022.

Caso clínico 3

Hombre de 30 años, en situación de calle, consumo problemático de sustancias ilícitas, HIV/sida diagnosticado en otra institución en 2019, asociado a TB resistente a R detectado con Xpert®MTB/RIF, cuyo tratamiento efectuó irregularmente (se desconoce el esquema indicado), así como el TARV.

Ingresó al Hospital Muñiz en abril de 2020, CD4+=70 céls/ μ L. Presentaba adenopatías cervicales y supraes-ternales, la muestra obtenida por punción ganglionar mostró *Mtb* resistente a R (Xpert®MTB/RIF, mutación en el gen *rpoB* S450L) e H a alta y baja concentración (mutación S315T en el gen *katG*, detectada por PCR multiplex alelo específica). Ambas resistencias también fueron detectadas con el método fenotípico (MGIT 960). Aunque se indicó tratamiento con moxifloxacina, Lzd, E, Z, Cs y amikacina nunca llegó a completar un mes continuado durante sus internaciones, dado que se retiraba sin consentimiento médico.

En marzo de 2021, el aspirado ganglionar, resultó resistente a R y sensible a H (MGIT 960 y medio sólido) sin mutación en *katG* 315 según la técnica PCR multiplex alelo específica. Falleció en su última internación, en marzo de 2022, con TB diseminada y falla multiorgánica.

En la Tabla 1 se resume la información sobre el diagnóstico bacteriológico de estos tres casos.

Los tres pacientes dieron su consentimiento para la publicación en forma anónima de sus casos.

Discusión

La Organización Mundial de la Salud estimó para 2021 una incidencia de TB-MDR y RR de

450 000 nuevos casos⁵. Dentro de la población de casos presuntamente sensibles, se alberga una proporción de infecciones mixtas, que incluyen la HTR y que es mayor en países de alta prevalencia de TB y TB-DR^{6,7}.

La detección precoz de la HTR en tuberculosis se considera un aspecto clave y emergente en el diagnóstico que merece ser investigado, ya que afecta a la posterior evolución del paciente y al tipo y duración del tratamiento instituido^{3,8,9}.

La identificación de la HTR es altamente relevante cuando la población que presenta resistencia a algunos de los fármacos principales no puede ser detectada, ya sea por métodos moleculares o fenotípicos convencionales. En consecuencia, el paciente será tratado sin considerar dicha posibilidad, favoreciendo el desarrollo y crecimiento de la población resistente. Esto se puede traducir en fracaso terapéutico, potencial amplificación de resistencias, y un consecuente empeoramiento del pronóstico del paciente⁹.

La HTR es una situación que los modernos métodos de diagnóstico molecular permiten detectar con mayor facilidad, centrándose en la SGC. Se la ha detectado a distintas drogas an-

TABLA 1 | Resumen de los tres casos analizados

	Muestra	Fecha	Método	Resultado
Paciente 1	Aspirado ganglionar	Nov/2022	Xpert®MTB/RIF Ultra	<i>Mtb</i> , RR
			MGIT 960	RR, sensible a H
			SGC	Se detectó mutación L452P en <i>rpoB</i>
	Espuito	Nov/2022	MGIT 960	Sensible a H y R
			SGC	No se detectaron mutaciones
Paciente 2	Aspirado ganglionar	Feb/2019	Xpert®MTB/RIF	<i>Mtb</i> , RR
			MGIT 960	RR, sensible a H
	Espuito	Mar/2019	Xpert®MTB/RIF	<i>Mtb</i> , SR
			MGIT 960	Sensible a H y R
Paciente 3	Punción ganglionar	Abr/2020	Xpert®MTB/RIF	<i>Mtb</i> , RR
			MAS-PCR	Resist a H (S315T en <i>KatG</i>) y resist a R (S450L en <i>rpoB</i>)
			MGIT 960	RR y a H
	Punción ganglionar	Mar/2021	MGIT 960	<i>Mtb</i> RR y sensible a H
			MAS-PCR	Mutación S315T en <i>KatG</i> ausente y mutación S450L en <i>rpoB</i> presente
		MGIT960 y PS en medio sólido	Sensible a H	

H: isoniacida; R: rifampicina; RR: resistente a rifampicina; SGC: secuenciación de genoma completo; MAS-PCR: Multiplex allele-specific polymerase chain reaction; MGIT 960: Mycobacteria growth indicator tube 960; Xpert®MTB/RIF: Detección del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* y de las mutaciones asociadas a la resistencia a la rifampicina por PCR en tiempo real; la variante Ultra tiene mayor sensibilidad

ti-TB, especialmente a R e H², pero también en fluoroquinolonas¹⁰. Su incidencia es desconocida, aunque existen estudios puntuales como el de Muluwork y col.⁶ que en Etiopía hallaron una proporción del 9.8% en 123 cepas estudiadas.

Existe discusión sobre el método óptimo para detectar la HTR. Se considera en la actualidad que la tecnología óptima es SGC ya que permite identificar poblaciones minoritarias que presentan algunas mutaciones puntuales respecto a la población mayoritaria de la muestra obtenida del paciente^{1,11}.

La OMS considera una prioridad la investigación de la HTR⁸, dadas las implicancias pronósticas y terapéuticas que representa el balance en la coexistencia de resistencia y sensibilidad en variantes de una misma cepa o en diferentes cepas.

En los 3 pacientes, los distintos aislamientos fueron derivados al Servicio de Micobacterias del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, donde se confirmaron los resultados de los perfiles de resistencia y se realizó SGC que mostró identidad clonal absoluta entre los aislamientos con distinto perfil de resistencia y la consecuente existencia de HTR monoclonal.

Los pacientes, que tuvieron en común la infección por HIV y el antecedente de escasa adherencia, iniciaron tratamiento acorde al estudio de sensibilidad inicial, usualmente mediante el Xpert[®]MTB/RIF y su variante de introducción más reciente Xpert[®]MTB/RIF Ultra. Ante la discordancia de resultados entre muestras de distintos orígenes o inclusive provenientes del mismo órgano (ganglio) y en alguno de ellos en-

tre el método molecular rápido y el fenotípico, la SGC permitió demostrar la identidad genética de los aislamientos, así como variaciones en la resistencia no detectadas previamente en una misma cepa debido a que presenta mayor sensibilidad para detectar HTR que los otros métodos moleculares y el MGIT. En consecuencia, los esquemas terapéuticos se ampliaron de acuerdo con los hallazgos microbiológicos, cubriendo sensibilidad y resistencia de cada cepa.

En la evolución, uno de los pacientes falleció por intercurrentes relacionadas a su inmunosupresión; de los dos restantes, uno finalizó el tratamiento y el otro aún continúa, aunque con graves dificultades en la adherencia.

Consideramos que es importante tener en cuenta la posibilidad de HTR, principalmente en pacientes con múltiples intentos terapéuticos previos y altas poblaciones bacilares, como en el sida avanzado. La obtención de distintas muestras de diferentes sitios anatómicos afectados permitió en los 3 casos demostrar fehacientemente HTR y adecuar la conducta terapéutica.

Las plataformas de biología molecular que realizan SGC de *Mtb* ofrecen un futuro promisorio con relación al diagnóstico de resistencias. Esto permitirá optimizar el tratamiento de los pacientes permitiendo indicar esquemas que cubran las cepas o variedades de cepas presentes en un mismo enfermo, que potencialmente podrían emerger en caso de una terapia que no las cubra.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Lozano N, Lanza VF, Suárez González J, et al. Detection of minority variants and mixed infections in *mycobacterium tuberculosis* by direct Whole-Genome Sequencing on noncultured specimens using a specific-DNA capture strategy. *mSphere* 2021; 6: e0074421.
2. Ye M, Yuan W, Molaeipour L, Azizian K, Ahmadi A, Kouhsari E. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2021; 20: 73.
3. Assis Figueredo LJ, de Almeida IN, Augusto CJ, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* heteroresistance by genotyping. *Int J Mycobacteriol* 2020; 9 :368-72.
4. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis*

- complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2578-86.
5. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 6. Muluwork G, Gobena, Helina M, Getu D, Dereje B. Genotypic and phenotypic drug-resistance detection and prevalence of heteroresistance in patients with isoniazid- and multidrug-resistant tuberculosis in Ethiopia. *IJID Reg* 2022; 2: 149-53.
 7. Abakur EHA, Alnour TMS, Abuduhier F, Albalawi FMA, Alfifi KAS. Emergence of heteroresistance *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. *Infect Disord Drug Targets* 2020; 20: 491-4.
 8. WHO. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 9. Shin SS, Modongo C, Baik Y, et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* strain infections are associated with poor treatment outcomes among patients with newly diagnosed tuberculosis, independent of pretreatment heteroresistance. *J Infect Dis* 2018; 218: 1974-82.
 10. Rigouts L, Miotto P, Schats M, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Scientific Reports* 2019; 9: 11760.
 11. Alcaidea F, Esteban J, González Martín J, Palacios JJ. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias (revisión). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017; 35: 527-33.