



ARTICOL ORIGINAL

Rezistența *Mycobacterium tuberculosis* la Linezolid – mutații asociate și factori de risc: studiu transversal, retrospectiv, analitic

Elena Chesov^{1,3,4}, Nelly Ciobanu^{1,2}, Dumitru Chesov^{1,3,4}, Christoph Lange^{3,4,7-9}, Jan Heyckendorf^{3,4,7}, Matthias Merker^{5,6}, Valeriu Crudu^{1,2}

¹Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

²Institutul de Ftiziopneumologie Chiril Draganiuc, Chișinău, Republica Moldova;

³Centrul German pentru Cercetarea Infecțiilor (DZIF), Partner site Hamburg-Lübeck-Borstel-Riems;

⁴Boli infecțioase clinice, Centrul de cercetare Borstel, Borstel Germania;

⁵Centrul național și supranațional de referință pentru micobacterii, Centrul de cercetare Borstel, Borstel Germania;

⁶Micobacteriologie moleculară și experimentală, Centrul de Cercetare Borstel, Borstel, Germania;

⁷Medicină respiratorie și sănătate internațională, Universitatea din Lübeck, Lübeck, Germania;

⁸Departamentul de Medicină, Universitatea din Umeå, Umeå, Suedia;

⁹Programul Global TB, Colegiul de Medicină Baylor și Spitalul de copii Texas, Houston, TX, SUA.

Data primirii manuscrisului: 20.08.2021
Data acceptării spre publicare: 05.09.2021

Autor corespondent:

Elena Chesov, asistent universitar
Catedra de biologie moleculară și genetică umană
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”
str. Ștefan cel Mare și Sfânt 165, Chișinău, Republica Moldova, MD 2004
e-mail: elena.chesov@usmf.md

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

La ora actuală sunt descrise mai multe mutații în genele rplC și rrl asociate cu rezistența *M. tuberculosis* la linezolid. Cu toate acestea, corelațiile genetice nu sunt bine cunoscute pentru toate tulpinile rezistente la linezolid, în special lipsesc datele despre tulpinile izolate de la bolnavii de tuberculoză din țările cu povară înaltă de tuberculoză multidrog rezistentă (TB-MDR) din Europa de Est. De asemenea, există date foarte limitate cu privire la factorii de risc clinici și microbiologici asociați cu rezistența la linezolid în tulpinile de *M. tuberculosis*.

Ipoteza de cercetare

La majoritatea tulpinilor de *M. tuberculosis* izolate de la pacienții cu expunere anterioară la linezolid din țările cu povară înaltă de TB-MDR, rezistența la linezolid este determinată de un set limitat de mutații în genele rplC și rrl. Gestionarea clinică

ORIGINAL ARTICLE

Linezolid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* – associated mutations and risk factors: cross-sectional retrospective analytical study

Elena Chesov^{1,3,4}, Nelly Ciobanu^{1,2}, Dumitru Chesov^{1,3,4}, Christoph Lange^{3,4,7-9}, Jan Heyckendorf^{3,4,7}, Matthias Merker^{5,6}, Valeriu Crudu^{1,2}

¹Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

²Chiril Draganiuc Phthisiopneumology Institute, Chisinau, Republic of Moldova;

³German Centre for Infection Research (DZIF), Partner site Hamburg-Lübeck-Borstel-Riems;

⁴Clinical Infectious Diseases, Research Center Borstel, Borstel Germany;

⁵National and Supranational Reference Center for Mycobacteria, Research Center Borstel, Borstel Germany;

⁶Molecular and Experimental Mycobacteriology, Research Center Borstel, Borstel, Germany;

⁷Respiratory Medicine & International Health, University of Lübeck, Lübeck, Germany;

⁸Department of Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden;

⁹Global TB Program, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital, Houston, TX, USA.

Manuscript received on: 18.08.2021
Accepted for publication: 05.09.2021

Corresponding author:

Elena Chesov, university assistant
Chair of molecular biology and human genetics
Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy
165, Stefan cel Mare si Sfânt, Chisinau, Republic of Moldova, MD 2004
e-mail: elena.chesov@usmf.md

What is not known yet, about the topic

Several mutations in rplC and rrl genes have been shown to be associated with linezolid resistance in *M. tuberculosis*. However genetic correlates in all linezolid resistant strains are not well understood, particularly there are missing data on clinical isolates from high multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) burden countries from Eastern Europe. As well there are very limited data on clinical and bacterial risk factors associated with emergency of linezolid resistance in *M. tuberculosis* clinical isolates.

Research hypothesis

In most of the *M. tuberculosis* strains isolated in patients with previous exposure to linezolid in high MDR-TB burden countries, resistance to linezolid is determined by a limited sets of mutations in rplC and rrl genes. Clinical mismanagement

defectuoasă a cazurilor de TB-MDR în țările cu povară înaltă de tuberculoză și resurse limitate ar putea contribui la apariția de noi tulpini rezistente la linezolid.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

S-a demonstrat că în regiunile cu povară înaltă a TB-MDR, cum este Republica Moldova, la majoritatea pacienților TB-MDR rezistența la linezolid este asociată cu un set de câteva mutații în genele *rplC* și *rrl*. De asemenea, s-a stabilit rolul critic al regimurilor terapeutice suboptimale în apariția rezistenței la linezolid a tulpinilor de *M. tuberculosis*.

Rezumat

Introducere. Linezolidul (LNZ) este unul dintre principalele medicamente utilizate în tratamentul tuberculozei multidrog-rezistente (TB-MDR). La moment determinantele genetice asociate cu rezistența la LNZ nu sunt pe deplin caracterizate. Scopul studiului a fost de a descrie mutațiile asociate cu rezistența la LNZ prin aplicarea secvențierii întregului genom (WGS) și evaluarea factorilor de risc asociați cu rezistența la LNZ pe un set de tulpini de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) izolate de la bolnavii de TB-MDR din Republica Moldova.

Material și metode. A fost realizat un studiu retrospectiv transversal pe un set de tulpini de MTB preluate din biobanca Laboratorului Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei (LNRM). Au fost identificate toate tulpinile MTB stocate în perioada 2017-2018, obținute din sputa pacienților cu TB-MDR, care au administrat LNZ în schema de tratament pe parcursul ultimilor doi ani, indiferent de durata administrării LNZ. Au fost considerate eligibile pentru studiu doar tulpinile MTB izolate de la pacienții cu o expunere cumulativă la LNZ mai mare de 30 de zile. Datele WGS ale tulpinilor de MTB incluse în studiu au fost comparate cu rezultatele testelor fenotipice de sensibilitate pe medii lichide pentru 3 concentrații de LNZ (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L). Caracteristicile clinice ale pacienților din studiu au fost preluate din Registrul național electronic al bolnavilor cu TB (SIME-TB). Regresia logistică multiplă a fost efectuată pentru a determina factorii de risc pentru rezistența la LNZ.

Rezultate. 52/74 (70,3%) tulpini MTB au fost incluse în studiu, dintre acestea 15 (28,8%) au fost fenotipic rezistente la LNZ, dintre care în cazul a 12/52 (23,1%) tulpini a fost găsită o corelarea genotipică cu rezistența la LNZ. În 8 cazuri au fost găsite mutații în gena *rplC* (460T>C). În alte 4 cazuri, au fost identificate mutații în gena *rrl* (2746G>A; 2814G>T; 2810A>C; 2270G>T). S-a determinat o asociere semnificativă între rezistența la LNZ și numărul de medicamente active din regimul de tratament TB-MDR (OR 0,23; 95%CI -0,03 - 0,70; $p = 0,04$). O asociere mai slabă s-a stabilit cu numărul de doze de LNZ administrate anterior (OR 1,01; 95%CI 1,004-1,03; $p = 0,03$).

Concluzii. La majoritatea tulpinilor de MTB studiate, rezistența la LNZ a fost asociată cu mutații în genele *rrl* și *rplC*. Numărul insuficient de medicamente active în regimul de tratament al TB-MDR crește șansele de apariție a rezistenței la LNZ.

Cuvinte-cheie: tuberculoză, WGS, rezistența la linezolid, factori de risc.

of the MDR-TB cases in resource limited high burden MDR-TB countries might contribute to the emergency of new linezolid resistant strains.

Article's added novelty on this scientific topic

We have proved that in high MDR-TB burden setting as Republic of Moldova a set of a few mutations in *rplC* and *rrl* genes are associated with linezolid resistance in most of the MDR-TB patients. As well we shown the critical role of suboptimal MDR-TB treatment regimen for the emergence of linezolid resistance in this setting.

Abstract

Introduction. Linezolid (LNZ) is one of the main drugs used for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) treatment. Genetic targets associated with resistance to LNZ are not fully characterized. The aim of the study was to describe mutations associated with LNZ resistance by applying whole genome sequencing (WGS) and to assess the risk factors for LNZ resistance in a set of *M. tuberculosis* clinical isolates from the Republic of Moldova.

Material and methods. We conducted a retrospective cross-sectional study on a set of MTB isolates retrieved from the biobank of National Reference Laboratory for Tuberculosis Microbiology (NRLM). We identified all sputum culture isolates stored during 2017-2018, obtained from adult MDR-TB patients who had LNZ as part of their MDR-TB treatment at any time during two years before the collection corresponding sputum sample. Only isolates from patients with a cumulative exposure to LNZ longer than 30 days were considered eligible for the study. We performed WGS of the MTB strains and compared these results with liquid culture-based susceptibility tests on 3 concentrations of LNZ (0.5 mg/L; 1.0 mg/L; 2.0 mg/L). The clinical characteristics of the study patients were retrieved from the National TB Data Base (SIME-TB). The multiple regression analysis was performed to assess risk factors for LNZ resistance.

Results. 52/74 (70,3%) isolates were included into the study of them 15 (28,8%) were phenotypically LNZ resistant. However only in 12/52 (23,1%) isolates genotypic correlates of LNZ resistant was found. In 8 cases mutations were detected in the *rplC* gene (460T>C). In other 4 cases the identified mutation implied *rrl* gene (2746G>A; 2814G>T; 2810A>C; 2270G>T). In a multivariate logistic regression model, significant association between LNZ resistance and the number of the active drugs in the MDR-TB treatment regimen (OR 0,23; 95%CI 0,03 – 0,70; $p = 0,04$) was found. A weaker association was found with the number of the previously taken LNZ doses (OR 1,01; 95%CI 1,004 – 1,03; $p=0,03$).

Conclusions. In most of the studied MTB isolates LNZ resistance was associated with mutations in the *rrl* and *rplC* genes. A reduce number of the active drugs in the LNZ containing treatment regimen increase the chance of LNZ resistance emergence.

Key words: tuberculosis, WGS, linezolid resistance, risk factors.

Introducere

Tuberculoza (TB) este o cauză majoră de morbiditate și mortalitate la nivel mondial [1]. Chiar dacă tuberculoza este considerată o boală care poate fi vindecată, rata succesului terapeutic la pacienții cu tuberculoză se reduce dramatic atunci când boala este cauzată de tulpini de MTB cu rezistență multiplă la medicamente (MDR), adică tulpini rezistente la două dintre cele mai puternice medicamente antituberculoase, izoniazida și rifampicina [2]. Pentru a îmbunătăți rezultatele tratamentului TB-MDR, în ultimii ani au fost introduse în practica clinică câteva medicamente antituberculoase. Printre acestea linezolidul, derivat al oxazolidinonei, care a fost recent clasificat de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) ca medicament din grupa A pentru tratamentul TB-MDR [3]. Aceasta implică utilizarea linezolidului la toți pacienții cu TB-MDR la care tulpina de MTB nu este rezistentă față de acest medicament. Rata rezistenței la linezolid în tulpinile de MTB izolate în condiții clinice variază considerabil în studiile publicate până în prezent [4]. Răspândirea în continuare a tulpinilor rezistente la linezolid ar putea limita utilizarea acestui medicament pe viitor. Până în prezent, au fost propuse două potențiale determinante ale apariției rezistenței la linezolid la tulpinile de MTB. Prima este dată de faptul că biodisponibilitatea linezolidului este frecvent redusă din cauza toxicității mitocondriale, ceea ce duce la o expunere suboptimală la medicament și la generarea mutațiilor rezistente [5]. Cea de a doua este condiționată de opțiunile terapeutice frecvent limitate în cazurile de TB-MDR, circumstanțe în care linezolidul poate fi parte a unui regim terapeutic suboptimal, cu creșterea riscului de dobândire a rezistenței [6]. Aceștia, precum și alți factori de risc microbiologici și clinici pentru rezistența la linezolid necesită a fi evaluați. De asemenea, corelațiile genotipice ale rezistenței la linezolid nu sunt complet cunoscute și necesită a fi studiate în continuare. În special, sunt puține datele referitoare la tulpinile de MTB izolate de la bolnavii din țările cu povară înaltă de TB-MDR din Europa de Est.

Republica Moldova este o țară est-europeană cu povară înaltă de TB-MDR, având una dintre cele mai mari rate de MDR în rândul cazurilor noi de retratament a TB [1]. Recent, Protocolul clinic național „Tuberculoza la adult” a fost revizuit și ajustat la recomandările OMS recente, inclusiv în ceea ce privește utilizarea linezolidului la pacienții cu TB-MDR [3]. Astfel, utilizarea linezolidului se extinde progresiv în acest context. Pentru o utilizare clinică mai eficientă a medicamentului deosebit de importante sunt datele privind mecanismele genetice de dobândire a rezistenței la linezolid cât și factorii de risc asociați acesteia. În studiul dat ne-am propus să descriem spectrul mutațiilor asociate cu rezistența la linezolid și să evaluăm factorii de risc potențial asociați cu rezistența la linezolid pe un set de tulpini MTB-MDR izolate de la pacienții din Republica Moldova cu expunere terapeutică anterioară la linezolid.

Material și metode

A fost efectuat un studiu retrospectiv transversal pe un set de tulpini MTB preluate din biobanca Laboratorului Național

Introduction

Tuberculosis (TB) is among the leading causes of morbidity and mortality worldwide [1]. Even if TB is considered in principle a curable disease, the rate of positive treatment outcome in TB patients is dramatically reduced when the disease is caused by the multi drug resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains, i.e. strains resistant to two most potent antituberculosis drug, isoniazid and rifampicin [2]. To improve MDR-TB treatment outcome a few new and repurposed TB drugs have been introduced into the clinical practice during the last years. Among them linezolid, an oxazolidinone, has been recently recommended by World Health Organization (WHO) as a group A drug for the treatment of MDR-TB [3]. That implies its use in all MDR-TB patients in whom MTB strain is not resistant to linezolid. A variable rate of linezolid resistant MTB strains have been reported in clinical isolates until now [4]. Further spread of linezolid resistant strains could limit the use of this drug in the upcoming future. Two potential risk factors leading to linezolid resistance have been hypothesized so far. First, linezolid dosing is frequently reduced due to mitochondrial toxicity, leading to suboptimal drug exposure and subsequent selection of resistant mutant [5]. Second, there are limited treatment options for MDR-TB and linezolid may be added to an inadequate regimen, increasing the risk of resistance acquisition [6]. These as well as other microbiological and clinical risk factors associated with the linezolid resistance should be explored. As well the genotypic correlates of linezolid resistance are not completely characterized and need further assessment. Particularly are limited the data on clinical isolates from high MDR-TB burden Eastern European countries.

Republic of Moldova is a high MDR-TB burden Eastern European country with one of the highest rates of MDR among new a retreated TB cases [1]. Recently the Moldovan National TB Protocol has been revised and adjusted to the latest WHO treatment guidelines, inclusively regarding the use of linezolid in MDR-TB patients [3]. Thus, the use of linezolid extends progressively in this setting. Data on linezolid genetic mechanisms and risk factors associated with resistance acquisition on isolates from this setting will be helpful for a more efficient clinical use of the drug. In the present study we aimed to describe the spectrum mutations associated with linezolid resistance and to assess potential risk factors associated with resistance to linezolid on a set of clinical MDR-MTB isolates from patients with previous therapeutical exposure to linezolid from the Republic of Moldova.

Material and methods

We conducted a retrospective cross-sectional study on a set of MTB isolates retrieved from the biobank of National Reference Laboratory for Tuberculosis Microbiology (NRLM). At the NRLM's biobank we identified all sputum culture isolates stored during 2017-2018, obtained from adult MDR-TB patients who had linezolid as part of their MDR-TB treatment at any time during two years before the collection correspond-

de Referință în Microbiologia Tuberculozei (LNRM). Au fost identificate toate tulpinile de MTB izolate și stocate în perioada 2017-2018 în biobanca LNRM, obținute din sputa pacienților adulți cu TB-MDR, care au administrat linezolid în schema de tratament în orice perioadă, pe parcursul ultimilor doi ani (Figura 1). Au fost considerate eligibile pentru studiu doar tulpinile MTB izolate de la pacienții cu expunere cumulativă la linezolid mai mare de 30 de zile. De la fiecare pacient eligibil a fost inclusă doar o singură tulpină de MTB izolată din spută.

Toate tulpinile MTB incluse în studiu au fost reînsămânțate, cu extragerea ulterioară a ADN-ului și secvențierea întregului genom.

Caracteristicile demografice și clinice ale pacienților, din

ing sputum sample (Figure 1). Only isolates from patients with a cumulative exposure to linezolid longer than 30 days were considered eligible for the study. From each eligible patients only one sputum isolate was included.

All retrieved isolates were regrown, the MTB DNA were extracted and sequenced using whole generation sequencing.

Demographic and clinical characteristics of the patients, whose sputum culture isolates were included in the study, as well the details about their therapeutical exposure to linezolid was retrieved for the National Electronic TB Database (SIME-TB). Also, from SIME-TB were retrieved the data on phenotypic drug susceptibility test (DST) of the included isolates assessed at the time of isolate storage in the biobank.

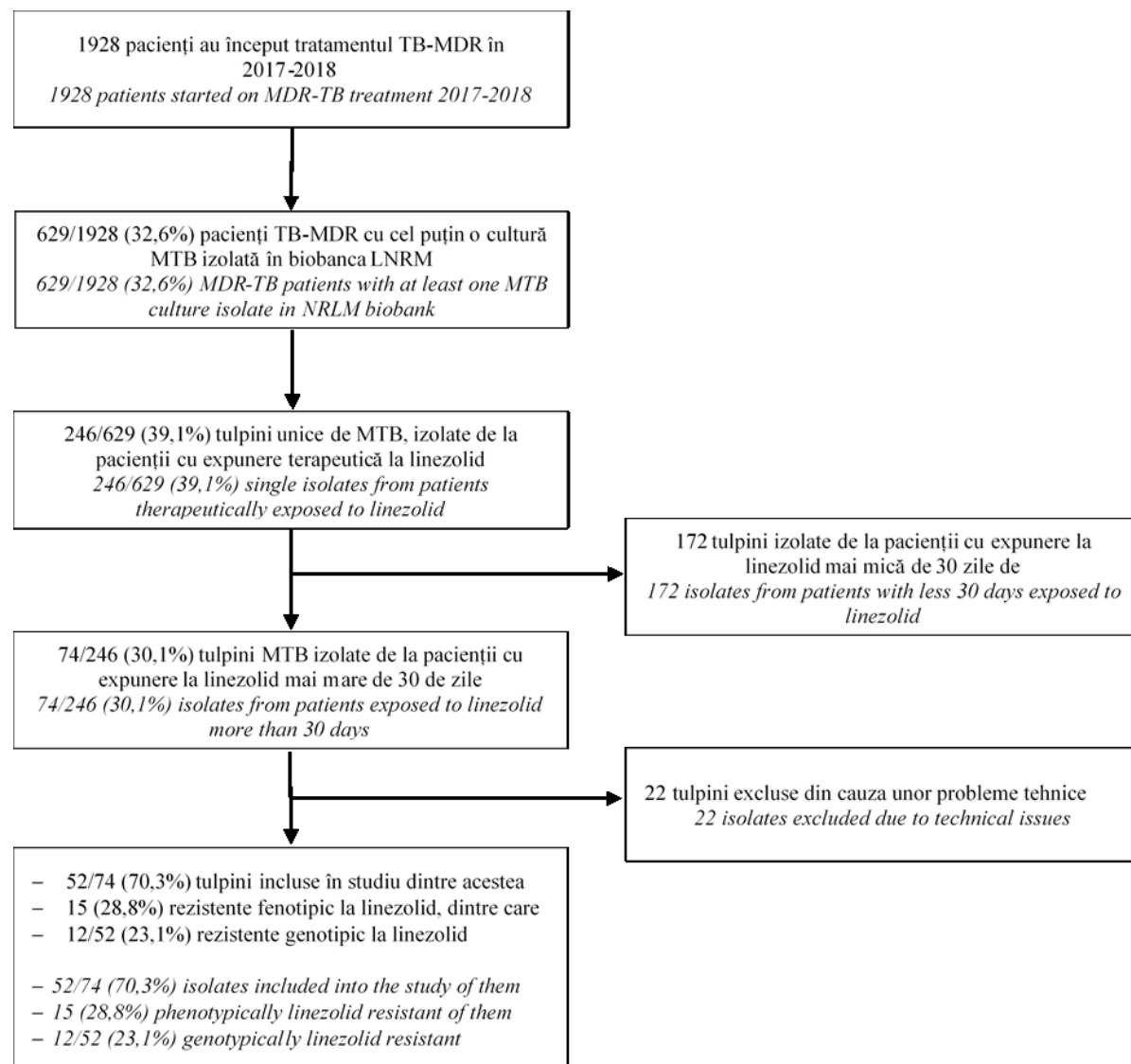


Fig. 1 Design-ul studiului.

Notă: MDR-TB – tuberculoza multirezistentă, LNRM – Laboratorul Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei, MTB – *Mycobacterium tuberculosis*.

Fig. 1 Study flowchart.

Note: MDR-TB – multidrug-resistant tuberculosis, NRLM – National Reference Laboratory for Tuberculosis Microbiology, MTB – *Mycobacterium tuberculosis*.

sputa cărora au fost izolate tulpinile de MTB incluse în studiu, precum și detaliile privind expunerea terapeutică la linezolid au fost preluate din Registrul național electronic al bolnavilor TB (SIME-TB). De asemenea, din SIME-TB au fost preluate datele privind testul fenotipic de sensibilitate la medicamente (DST) în bază de cultură al tulpinilor incluse, evaluat la momentul stocării tulpinilor în biobancă.

Colectarea tulpinilor MTB

LNRM este un laborator de nivelul trei care realizează toate tipurile de teste microbiologice pentru diagnosticul infecției cu MTB. LNRM face parte din Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” (IFP), o instituție medicală de nivel terțiar, care oferă asistență medicală pentru pacienții cu tuberculoză și alte boli respiratorii non-TB. Astfel, LNRM asigură tot spectrul de teste microbiologice pentru diagnosticul TB la pacienții consultați și/sau internați la IFP. De asemenea, LNRM asigură creșterea și izolarea culturii MTB din sputa pacienților și testarea sensibilității fenotipice, pentru un spital de TB de nivel secundar din Chișinău și pentru cabinetele TB din Chișinău și din zona de sud a țării. La fel, asigură evaluarea controlului calității pentru trei laboratoare regionale de TB existente în țară. Din totalul probelor procesate în mod curent la LNRM, culturile pozitive izolate din spută și procesate în scop de diagnostic sunt de obicei stocate în biobancă. De asemenea, o parte din culturile pozitive efectuate pentru urmărirea tratamentului sunt stocate în biobancă, în deosebi în cazul pacienților cu tuberculoză, care nu reușesc să obțină conversia culturii.

Teste microbiologice

Toate probele preluate din biobancă și incluse în studiu au fost reînsămânțate pe medii solide (Löwenstein-Jensen) în conformitate cu recomandările tehnice ale OMS [7]. Pentru toate tulpinile de MTB reînsămânțate, a fost efectuată testarea sensibilității fenotipice pentru concentrațiile de linezolid: 0,5 mg/L, 1,0 mg/L (concentrație critică recomandată de OMS) și 2,0 mg/L, fiind utilizat sistemul BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, SUA). Testele de sensibilitate fenotipică la medicamente pentru alte tipuri de antibiotice au fost efectuate în MGIT960, la concentrații critice recomandate de OMS, fiind realizate în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Becton Dickinson, SUA).

Extracția ADN

Pentru extragerea ADN-ului, coloniile de MTB reînsămânțate au fost transferate într-un tub de microcentrifugă (2,0 ml) care conținea 400 μl de tampon TE, apoi încălzite timp de 20 de minute la 80°C. După 3 min de centrifugare, supernatantul, a fost eliminat și s-au adăugat 400 μl de tampon TE, urmat de vortexare pentru a separa celulele. Apoi s-au adăugat 50 μl de lizozim, s-a vortexat și s-a incubat soluția peste noapte la 37°C. A doua zi, s-au adăugat 70 μl de SDS 10%, 5 μl de proteinază K, s-a vortexat și s-a incubat soluția 10 minute la 65°C. Ulterior, s-a adăugat 100 μl de NaCl 5M, 100 μl de CTAB/NaCl, urmat de vortexare și incubare timp de 10 min la 65°C. Apoi au fost adăugate 750 μl de amestec cloroform/izoamilcool, cu inversarea și centrifugarea ulterioară a tuburilor la temperatura camerei timp de 15 min. Supernatantul a fost transferat într-un nou tub de microcentrifugă, fiind adăugat un volum de 0,6 de izopropanol pentru precipitarea acizilor nucleici timp de 30

Settings

NRLM is a tertiary level laboratory performing all types of microbiological tests for the diagnosis of MTB infection. NRLM is part of Chiril Draganiuc Phthisiopneumology Institute (PPI), a tertiary level medical institution which provides medical care for patients with TB and other non-TB respiratory diseases. Thus, NRLM ensure all spectrum of TB microbiological test in patients consulted and/or admitted to PPI. As well NRLM ensure the sputum culture and phenotypic DST for a secondary level TB hospital in Chisinau and TB cabinets from Chisinau and from southern counties of the country. As well it provides the quality control assessment for three regional TB laboratory existing in the country. From the pool of the sputum samples process routinely at NRLM, isolates from positive sputum cultures performed for diagnostic purposes were usually stored in the biobank. As well a part of the isolates from positive sputum culture performed for treatment follow up are also stored in the biobank, particularly these is the case of TB cases which fail to achieve sputum culture conversion.

Microbiological tests

All sputum culture isolates retrieved from the biobank and included into the study were regrown on solid media (Löwenstein-Jensen) according to the WHO technical recommendations [7]. For all regrown isolates, we determined growth at 0,5 mg/L, 1,0 mg/L (corresponding to the WHO critical concentration), and 2,0 mg/L of linezolid using the BACTEC MGIT960 system (Becton Dickinson, USA). Routine drug susceptibility testing for other antibiotics was performed in MGIT960 using critical concentrations recommended by WHO and according to manufactures instruction (Becton Dickinson, USA).

DNA extraction

For the DNA extraction, colonies of regrown isolates were transferred to a microcentrifuge tube (2,0 ml) containing 400 μl TE buffer and heated for 20 min at 80°C. After 3 min centrifugation the supernatant was discarded and 400 μl TE-buffer was added, followed by vortexing to separate cells. Then added 50 μl lysozyme, vortexed and incubated the solution overnight at 37°C. Later 70 μl 10% SDS and 5 μl proteinase K, was added, vortexed and incubated the solution 10 min at 65°C. Afterwards 100 μl 5M NaCl, 100 μl CTAB/NaCl was added, followed by vortexing and incubation for 10 min at 65°C. Then 750 μl Chloroform/Isoamylalcohol mix, was added, the tube was inverted and centrifuged at room temperature for 15 min. The supernatant was transferred to a new microcentrifuge tube, and 0.6 volume isopropanol was added to precipitate the nucleic acids for 30 min at -20°C. Then centrifuged and discarded the supernatant. The DNA was washed in 0,5 ml of 75% ethanol, centrifuged, and discarded the supernatant The DNA-pellet was dried at 60°C for about 10 min, and dissolved in 100 μl TE-buffer at 37°C for 30 min.

Whole genome sequencing

Isolated DNA of MTB isolates was subjected to whole genome sequencing at the Research Center Borstel, Germany with a minimum average genome coverage of 50x, using paired-end DNA libraries and Illumina technology (NexteraXT and NextSeq500) according to the manufacturer's instructions (Illumina, USA). The sequencing data were mapped to

min la -20°C. Apoi s-a centrifugat și aruncat supernatantul. S-a spălat ADN-ul în 0,5 ml de etanol 75%, s-a centrifugat și aruncat supernatantul. Peletul de ADN a fost uscat la 60°C timp de aproximativ 10 minute, iar ADN-ul a fost dizolvat în 100 µl de tampon TE timp de 30 de minute la 37°C.

Secvențierea întregului genom

ADN-ul extras din tulpinile de MTB izolate, a fost supus secvențierii întregului genom la Centrul de cercetare Borstel, Germania. Media minimă de acoperire a genomului a fost de 50x, utilizându-se librării de ADN tip pereche și tehnologia Illumina (Nextera-XT și NextSeq500) în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Illumina, SUA). Datele de secvențiere au fost aliniat la genomul de referință *M. tuberculosis* H37Rv (ID GenBank: NC_000962.3) utilizându-se filtrul MTBseq [8]. Au fost luate în considerare mutațiile în 92 de gene asociate cu rezistența la medicamente cu cel puțin o citire în ambele direcții ale genei, și o citire care să numească alela cu un scor phred minim de 20. Am evaluat polimorfismele unui singur nucleotid, inserțiile și delețiile. Predicția rezistenței genotipice a fost realizată pe baza catalogului de mutații disponibil la Centrul de Cercetare Borstel, Germania, actualizare Mai 2021.

Analiza statistică

Variabilele continue au fost prezentate sub formă de medii sau mediane cu deviație standard sau intervalul dintre quartile, corespunzător. Variabilele categoricale au fost prezentate ca valori procentuale. Compararea variabilelor continue parametrice și neparametrice a fost realizată prin testul t-student sau testul Mann-Whitney, corespunzător. La compararea frecvențelor s-a aplicat testul exact a lui Fischer. Pentru comparațiile variabilelor împerecheate s-a folosit testul Wilcoxon. Pentru evaluarea asocierii dintre potențialii factori de risc și rezistența la linezolid, s-a efectuat o analiză de regresie logistică. Fiecare variabilă independentă întâi a fost evaluată prin regresie logistică univariată, iar variabilele care au avut o valoare p mai mică de 0,25 au fost evaluate într-un model de regresie logistică multiplă. A fost considerată statistic semnificativă valoarea p mai mică de 0,05. Analiza statistică a fost efectuată în programul GraphPad Prism 9 v9.2.0.

Considerații etice

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova (procesul verbal nr. 49 din 12.04.2018).

Rezultate

În biobanca LNRM au fost identificate 629 tulpini izolate din sputa pacienților cu TB-MDR, care au avut cel puțin o cultură de MTB stocată în perioada 2017-2018. Două sute patruzeci și șase (39,1%) dintre acești pacienți au primit linezolidul ca parte a regimului de tratament pentru TB cu o durată variabilă pe parcursul ultimilor 2 ani înainte de prelevarea sputei. Dintre aceștia, doar în cazul a 74 de pacienți a fost identificată cel puțin o cultură de MTB, stocată în biobancă, după inițierea tratamentului cu linezolid și o durată de expunere la linezolid mai mare de 30 de zile (Figura 1). Din 74 de tulpini eligibile,

the *M. tuberculosis* H37Rv reference genome (GenBank ID: NC_000962.3) using the MTBseq pipeline [8]. We considered mutations in 92 genes associated with drug resistance [9]) and covered by a minimum of one read in both forward and reverse orientation. We assessed single nucleotide polymorphisms, insertions, and deletions. Genotypic resistance prediction was performed based on mutations catalogue available at the Research Center Borstel, Germany, May 2021 update.

Statistical analysis

The continuous variables were presented as means or median with standard deviation or the interquartile interval, correspondingly. Categorical variables were presented as frequencies. Comparison of the continuous parametric and non-parametric variables was done by t-student test or Mann-Whitney test, correspondingly. For the comparison of the frequencies Fischer exact test was applied. For paired comparisons Wilcoxon paired test was used. For the assessment of the association between potential risk factors and linezolid resistance, logistic regression analysis was performed. For that, each independent variable was initially assessed by univariate logistic regression and those which had a p value lower than 0,25 were assessed in a multivariate logistic regression model. A p value lower than 0,05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 9 v9.2.0 software.

Ethics

The study was approved by Ethical Committee of Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chișinău, Republic of Moldova (# 49 from 12.04.2018).

Results

At the NRLM biobank we have identified 629 unique MDR-TB patient who had at least on sputum culture isolate stored during 2017-2018. Of them 246 (39,1%) patients received linezolid as part of their TB treatment regimen at any time during previous 2 years prior sampling of the stored sputum isolate. Of these only 74 patients had at least one isolate collected at a time point when the cumulative duration of linezolid intake was longer than 30 days (Figure 1). We attempt to regrow by one isolate from each one of these 74 patients. Due to technical limitation only 52 (70,3%) isolates were possible to regrown and to include into the final analysis. Each regrown isolated belong to a different MDR-TB patient.

Study cohort characteristics

The mean age of the patients whose sputum culture isolates were included in the analysis was $38,8 \pm 8,5$ year old, of them 67,3% being male. Majority of the patients (84,6%) had a cavitary disease detected by chest radiography and 17,3% were HIV positive. The median number of linezolid doses previously received by the study patients was 347 (IQR 165 – 470,5). At the same time the number of the active drugs included into the linezolid containing regimen of the study patients was 3,0 (IQR 2,0 – 4,0).

According to WGS data 12 of the study isolates (23,1%) were resistant to linezolid. Patients with linezolid resistant strains had a higher number of taken linezolid doses as well

Tabel 1. Caracteristica cohorței.**Table 1.** Cohort characteristics.

| Parametri Parameters | Total N=52; n (%) | LNZ rezistent LNZ resistant N=12; n (%) | LNZ sensibil LNZ susceptible N=40; n (%) | p |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|--------|
| Genul (bărbați) Gender (male) | 35 (67,3) | 8 (66,7) | 27 (67,5) | 1,0 |
| Vârsta; media ± DS Age; mean ± SD | 38,5±8,5 | 33,5 ± 5,3 | 39,9 ± 8,8 | 0,01 |
| Reședință urbană Urban residence | 22 (42,3) | 4 (33,3) | 18 (45,0) | 0,52 |
| HIV pozitiv HIV positive | 9 (17,3) | 4 (33,3) | 5 (12,5) | 0,18 |
| Leziuni cavitare Cavitary lesions | 44 (84,6) | 10 (83,3) | 34 (85,0) | 1,0 |
| Retratament după eșec Retreatment after failure | 35 (67,3) | 11 (91,7) | 24 (60,0) | 0,08 |
| MTB linia 2 (Beijing) MTB lineage 2 (Beijing) | 33 (63,5) | 7 (58,3) | 26 (65,0) | 0,74 |
| MTB linia 4 (Ural/LAM) MTB lineage 4 (Ural/LAM) | 19 (36,5) | 5 (41,7) | 14 (35,0) | 0,74 |
| MDR + FQ rezistent MDR + FQ resistance | 40 (76,9) | 10 (83,3) | 30 (75,0) | 0,71 |
| Doze LNZ; mediana (IQR) LNZ doses; median (IQR) | 347,0 (165,0 – 470,5) | 576,5 (404,5 – 705,5) | 257,5 (120,5 – 376,5) | 0,0001 |
| Întrerupere LNZ LNZ interruption | 4 (7,7) | 1 (8,3) | 3 (7,5) | 1,0 |
| Medicamente active în schema de tratament cu LNZ; mediana (IQR)* Active drugs in LNZ regimen; median (IQR)* | 3,0 (2,0 – 4,0) | 1,5 (1,0 – 3,0) | 4,0 (2,5 – 4,0) | 0,0001 |
| Mutații compensatorii Compensatory mutations | 38 (73,1) | 10 (83,3) | 28 (70,0) | 0,5 |

Notă: MTB – *Mycobacterium tuberculosis*; FQ – fluoroquinolone, LNZ – linezolid, DS – deviația standard, IQR – intervalul dintre cuartile, LNZ – linezolid, * – evaluat conform datelor de secvențiere a întregului genom.

Note: MTB – *Mycobacterium tuberculosis*; FQ – fluoroquinolones, LNZ – linezolid, SD – standard deviation, IQR – interquartile range, LNZ – linezolid, * – assessed by whole genome sequencing data.

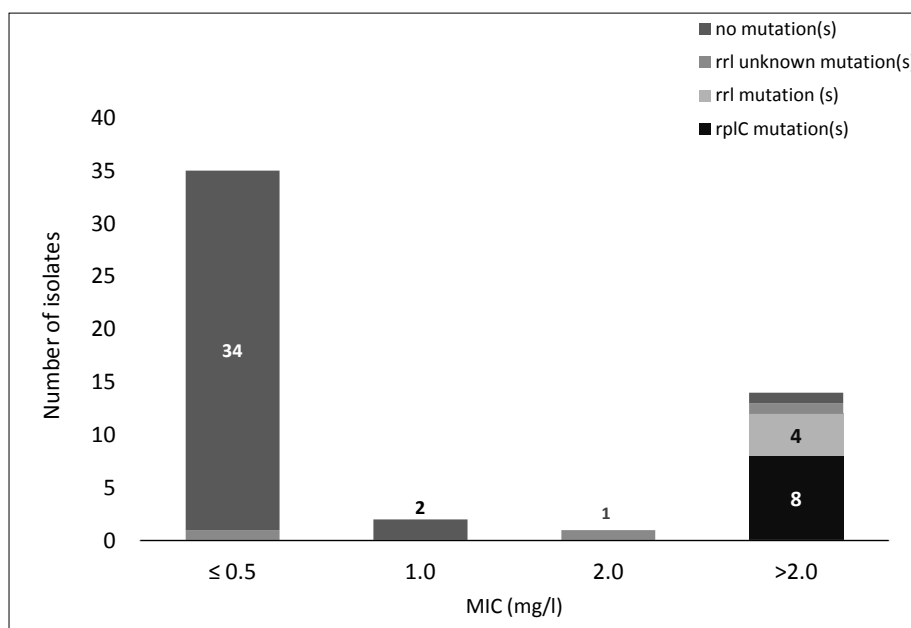


Fig. 2 Distribuția concentrației minime inhibitorii (CMI) la linezolid pentru tulpinile MTB și rezultatele secvențierii.
Fig. 2 Linezolid minimum inhibitory concentration (MIC) distribution for the analyzed clinical isolates and sequencing results.

creșterea MTB s-a reușit în cazul la 52 (70,3%) care au fost incluse în analiza finală.

Caracteristicile lotului studiat

Vârsta medie a pacienților ale căror tulpini MBT izolate din spută au fost incluse în analiză a fost de $38,8 \pm 8,5$ ani, dintre aceștia 67,3% fiind bărbați. Majoritatea pacienților (84,6 %) aveau leziuni cavitare pulmonare detectate la radiografia toracică, iar 17,3 % aveau statut HIV pozitiv. Mediana numărului de doze de linezolid anterior administrate pacienților incluși în studiu a fost de 347 (IQR 165 – 470,5). În același timp, numărul medicamentelor active incluse în regimul de tratament cu linezolid la pacienții analizați a fost de 3,0 (IQR 2,0-4,0).

Conform datelor WGS, 12 (23,1%) tulpini MTB au fost rezistente la linezolid. Pacienții cu tulpini rezistente la linezolid au avut un număr mai mare de doze de linezolid administrate, precum și un număr mai mic de medicamente active în regimul de tratament decât cei cu tulpini sensibile la linezolid (576,5 (IQR 404,5 – 705,5) față de 257,5 (IQR 120,5 – 376,5), $p = 0,0001$ și 1,5 (IQR 1,0 – 3,0) față de 4,0 (IQR 2,5 – 4,0), $p = 0,0001$, respectiv). Nu s-au constatat alte diferențe semnificative dintre pacienții cu tulpini rezistente la linezolid și cei cu tulpini sensibile la linezolid, cu excepția vârstei acestora ($33,5 \pm 5,3$ vs $39,9 \pm 8,8$, $p = 0,01$; Tabelul 1).

Rezistența genotipică a tulpinilor de MTB

Majoritatea tulpinilor analizate aparțin liniei genotipice 2 – 63,5%, celelalte tulpini aparținând liniei 4. WGS a confirmat profilul MDR al tuturor celor 52 de tulpini de MTB incluse în studiu. Dintre acestea, 72% prezentau mutații compensatorii în genele *rpoA* și *rpoC*. De asemenea, 76,9% dintre acestea prezentau rezistență suplimentară la fluorochinolone. Nu au existat diferențe statistice în ceea ce privește rata de rezistență la fluorochinolone, mutațiile compensatorii și frecvența liniilor genotipice între tulpinile rezistente la linezolid și cele sensibile la linezolid (Tabelul 1).

Numărul de tulpini cu rezistență genotipică la linezolid (12/52) diferă de cel detectat prin DST fenotipic bazat pe cultură, prin care s-au evidențiat 15 tulpini rezistente la linezolid. Pentru 8 tulpini rezistente la linezolid, a fost găsită mutația de tip substituție (460T>C) în gena *rplC*, în timp ce în cazul altor 4 tulpini au existat mai multe mutații de tip substituție în diferite poziții a genei *rrl* (*Rvnr02*) (Tabelul 2). În cazul unei singure tulpini cu rezistență fenotipică nu s-a găsit nici o mutație în genele *rplC* și *rrl*, în timp ce la alte 2 tulpini cu rezistență fenotipică au fost detectate mai multe mutații de tip substituție nucleotidică în diferite poziții a genei *rrl*, la care asocierea cu rezistența la linezolid nu este cunoscută, pentru tulpinile date nu au fost găsite mutații în gena *rplC*.

Toate tulpinile cu mutații rezistente în gena *rplC* au o concentrație minimă inhibitorie (CMI) a linezolidului mai mare de 2 mg/l, la fel și în cazul tulpinilor cu mutații rezistente în gena *rrl*. Majoritatea tulpinilor fără mutații în *rplC* și *rrl* au avut o CMI a linezolidului $\leq 0,5$ mg/l. Tulpina cu rezistență fenotipică la care nu s-au găsit mutații în gena *rplC*, sau la *rrl*, a avut o CMI a linezolidului de 2 mg/l (Figura 2).

Factori asociați cu rezistența la linezolid

Pentru a determina factorii de risc asociați cu rezistența

a lower number of the active drugs in the treatment regimen than those with linezolid susceptible strains (576,5 (IQR 404,5 – 705,5) vs 257,5 (IQR 120,5 – 376,5), $p = 0,0001$ and 1,5 (IQR 1,0 – 3,0) vs 4,0 (IQR 2,5 – 4,0), $p = 0,0001$, correspondingly). No other differences have been found in patients with linezolid resistant strains compared with those with linezolid susceptible strains, excepting their age ($33,5 \pm 5,3$ vs $39,9 \pm 8,8$, $p = 0,01$; Table 1).

Genotypic resistance of the MTB strains

Sixty-three-point two percent of the strains belonged to genotypical lineage 2 while others to lineage 4. WGS confirmed the MDR profile of all 52 MTB strains included into the study. Of them 72% had compensatory mutations in *rpoA* and *rpoC* genes. As well 76,9% had additional resistance to fluoroquinolones. There were no differences in the rate fluoroquinolone resistance, compensatory mutations, and frequency of lineages between linezolid resistant and linezolid susceptible strains (Table 1).

The number of strains with genotypic resistance to linezolid (12/52) differs of that detected by culture based phenotypic DST which shown 15 linezolid resistant strains. In 8 linezolid resistant strains resistance was associated with the same type of substitution (460T>C) in *rplC* gene while in other 4 strains with several different substitutions in *rrl* (*Rvnr02*) gene (Table 2). In one of the phenotypically resistant strains the wild type of both *rplC* and *rrl* genes were found, while other 2 phenotypically resistant strains carry a wild type *rplC* gene, and several different substitution mutations in the *rrl* gene, not known to be associated with resistance.

All resistant strains with mutations in *rplC* have a linezolid minimum inhibitory concentration (MIC) higher than 2 mg/l as well those strains with known resistant mutation in *rrl*. Majority of the strains without any mutation in *rplC* and *rrl* had a linezolid MIC $\leq 0,5$ mg/l. The phenotypically resistant strain with wild type of both *rplC* and *rrl* had a linezolid MIC of 2 mg/l (Figure 2).

Factors associated with linezolid resistance

To determine the risk factors for the emergence of linezolid resistance main demographical, clinical, and microbiological characteristics as well as factors characterizing the history of previous exposure to linezolid were primarily assessed by univariate logistic regression analysis. The following variables were subjects the univariate logistic regression analysis: gender, age, HIV status, place of residence, presence of cavities on radiography, MTB lineage, presence of compensatory mutations, number of taken linezolid doses, history of linezolid treatment interruption longer than 2 months, number of the active drugs in the TB treatment regimen assessed by WGS data (Table 3). Four of these variables – number of taken linezolid doses, number of the drugs in the regimen, HIV status and patient age – shown significant association in univariate analysis ($p < 0,25$) and were subsequently checked in a multivariate logistic regression model (Table 4). The latest identify a significant association between the emergence of linezolid resistance and the number of the active drugs in the MDR-TB treatment regimen (OR 0,23; 95%CI 0,03 – 0,70; $p = 0,04$). A weaker association was found with the number of the privi-

Tabelul 2. Mutațiile *M. tuberculosis* în genele *rrl* și *rplC* cu rezistență fenotipică la linezolid.**Table 2.** *rrl* and *rplC* mutations in *M. tuberculosis* with phenotypic linezolid resistance.

| Nr. | Pacient ID <i>Patient ID</i> | LNZ MGIT960 (mg/mL) | LNZ geno | <i>rplC</i> (%) | <i>rrl</i> (%) | Linia <i>Lineage</i> | Doze linezolid <i>Linezolid doses</i> |
|-----|---------------------------------|---------------------|----------|-----------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|
| 1 | BUA001 | >2,0 | R | WT | 2746G>A (99%) | Ural | 405 |
| 2 | KEG002 | >2,0 | R | WT | 2814G>T (98%) 2810A>C (98%) | Beijing | 690 |
| 3 | ERR003 | >2,0 | S | WT | 219G>C (1,3%)* | Beijing | 267 |
| 4 | MAA004 | >2,0 | R | 460T>C (100%) | WT | Beijing | 393 |
| 5 | SHP005 | >2,0 | R | 460T>C (94%) | WT | Beijing | 689 |
| 6 | LEI006 | >2,0 | R | WT | 2270G>T (2%) | Ural | 730 |
| 7 | BOS007 | >2,0 | R | 460T>C (73%) | WT | Ural | 656 |
| 8 | GRE008 | >2,0 | R | WT | 2814G>T (100%) | Beijing | 730 |
| 9 | MAV009 | >2,0 | R | 460T>C (100%) | WT | LAM | 351 |
| 10 | SME010 | >2,0 | R | 460T>C (26%) | WT | Beijing | 404 |
| 11 | SPO011 | >2,0 | R | 460T>C (96%) | WT | Beijing | 473 |
| 12 | STV012 | 2,0 | S | WT | 2434T>C (100%) 2691A>T (100%)* | Beijing | 362 |
| 13 | ZAI013 | >2,0 | S | WT | WT | Beijing | 182 |
| 14 | ROD014 | >2,0 | R | 460T>C (100%) | WT | Beijing | 497 |
| 15 | BOI043 | >2,0 | R | 460T>C (100%) | WT | Ural | 721 |

Notă: LNZ geno – sensibilitatea față de linezolid conform datelor secvențierii, S – sensibil, R – rezistent, WT- tip sălbatic, LNZ – linezolid, * – mutații necunoscute, considerate în studiu sensibile la linezolid.

Note: LNZ geno – linezolid susceptibility according to sequencing data, S – susceptible, R – resistant, WT- wild type, LNZ – linezolid, * – unknown mutations, considered susceptible to linezolid in the study.

Tabelul 3. Factori de risc pentru rezistența la linezolid, regresie logistică univariată.**Table 3.** Risk factors for linezolid resistance, univariate logistic regression.

| Factor | β | SE | p | OR | 95% CI |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|------|-------|------|--------------|
| Genul (femei) <i>Gender (female)</i> | 0,04 | 0,70 | 0,96 | 1,04 | 0,24 – 3,97 |
| Vârsta <i>Age</i> | -0,13 | 0,06 | 0,03 | 0,88 | 0,76 – 0,97 |
| Reședința urbană <i>Urban residence</i> | -0,49 | 0,69 | 0,5 | 0,61 | 0,14 – 2,28 |
| Total doze linezolid <i>Total linezolid doses</i> | 0,01 | 0,00 | 0,001 | 1,01 | 1,005 – 1,02 |
| Întrerupere linezolid <i>Linezolid interruption</i> | 0,11 | 1,21 | 0,92 | 1,12 | 0,05 – 9,80 |
| Mutații compensatorii <i>Compensatory mutations</i> | -0,76 | 0,85 | 0,37 | 0,47 | 0,06 – 2,13 |
| Medicamente active în schema de tratament <i>Active drugs in the regimen</i> | -1,49 | 0,47 | 0,00 | 0,23 | 0,07 – 0,49 |
| MBT linia 2 <i>MTB lineage 2</i> | -0,28 | 0,67 | 0,67 | 0,75 | 0,20 – 2,97 |
| Leziuni cavitare <i>Cavitary lesion</i> | -0,13 | 0,89 | 0,89 | 0,88 | 0,17 – 6,66 |
| HIV pozitiv <i>HIV positive</i> | 1,25 | 0,78 | 0,11 | 3,50 | 0,73 – 16,43 |

Notă: MTB – *Mycobacterium tuberculosis*, SE – eroarea standard, OR – raportul șanselor, 95%CI – 95% intervalul de încredere.

Note: MTB – *Mycobacterium tuberculosis*, SE – standard error, OR – odds ratio, 95%CI – 95% confidence interval.

Table 4. Factori de risc pentru rezistența la linezolid, regresie logistică multiplă.**Table 4.** Risk factors for linezolid resistance, multiple logistic regression.

| Factor | β | SE | p | OR | 95% CI |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|-------|------|------|--------------|
| Vârsta <i>Age</i> | -0,17 | 0,11 | 0,14 | 0,85 | 0,63 – 1,007 |
| Total doze linezolid <i>Total linezolid doses</i> | 0,01 | 0,005 | 0,03 | 1,01 | 1,004 – 1,03 |
| Medicamente active în schema de tratament <i>Active drugs in the regimen</i> | -1,49 | 0,72 | 0,04 | 0,23 | 0,03 – 0,7 |
| HIV pozitiv <i>HIV positive</i> | 0,33 | 1,49 | 0,83 | 1,39 | 0,07 – 35,7 |

Notă: SE – eroarea standard, OR – raportul șanselor, 95%CI – 95% intervalul de încredere.

Note: SE – standard error, OR – odds ratio, 95%CI – 95% confidence interval.

la linezolid, principalele caracteristici demografice, clinice și microbiologice, precum și factorii care caracterizează istoricul expunerii anterioare la linezolid au fost inițial evaluate prin regresie logistică univariată. Variabilele testate prin regresie logistică univariată au inclus: sexul, vârsta, statutul HIV, locul de reședință, prezența cavitaților la radiografie, linia MTB, prezența mutațiilor compensatorii, numărul de doze de linezolid administrate, istoricul întreruperii tratamentului cu linezolid mai mult de 2 luni, numărul de medicamente active din regimul de tratament al tuberculozei evaluat prin datele WGS (Tabelul 3). Patru dintre aceste variabile - numărul de doze de linezolid administrate, numărul de medicamente din schema de tratament, statutul HIV și vârsta pacientului – care au prezentat o asociere semnificativă în analiza univariată ($p < 0,25$) au fost verificate printr-un model de regresie logistică multivariată (Tabelul 4). Acestea au evidențiat a asociere semnificativă între rezistența la linezolid și numărul de medicamente active din regimul de tratament al TB-MDR (OR 0,23; 95%CI 0,03 – 0,70; $p = 0,04$). O asociere mai slabă a fost găsită cu numărul de doze de linezolid anterior administrate (OR 1,01; 95%CI 1,004 – 1,03; $p = 0,03$). Pentru ceilalți doi factori testați (statutul HIV și vârsta) nu au fost evidențiate asocieri semnificative.

Constatarea asocierii dintre numărul de medicamente active din regimul de tratament și rezistența la linezolid ne-a determinat să comparăm numărul de medicamente active din regimurile de tratament care conțin linezolid prescrise pacienților incluși în studiu din perspectiva rezultatelor fenotipice, a testului de sensibilitate și datelor WGS. Am constatat că conform rezultatelor WGS, mediana numărului de medicamente active din schemele de tratament este semnificativ mai mică decât cel administrat de facto, calculat în baza datelor testului de sensibilitate fenotipic și a prezumției de sensibilitate la medicamentele netestate, 3 (IQR 3-5) vs 5 (IQR 4,5-6), corespunzător, $p < 0,0001$ (Figura 3).

Discuții

În studiu prezent, am stabilit că în majoritatea cazurilor re-

ously taken linezolid doses (OR 1,01; 95%CI 1,004 – 1,03; $p = 0,03$). For the other two tested factors (HIV status and age) no significant association were found.

Our finding of association between the number of the active drugs in the treatment regimen and linezolid resistance made us to compare the number of the active drugs in the linezolid containing treatment regimens prescribed to our patients from perspective of phenotypic bases DST and WGS data. We found that when assessed by WGS the median number of the active drugs in the treatment regimens is significantly lower than that counted in the real life based on the phenotypic DST and presumption of susceptibility to the not tested drugs, 3 (IQR 3 – 5) vs 5 (IQR 4,5 – 6) correspondingly, $p < 0,0001$ (Figure 3).

Discussion

In this cross-sectional study, we found that the main genetic correlates of linezolid resistance in MTB strains in Moldovan settings are given by a set of substitution mutations in *rplC* and *rrl* genes. As well we found that the strongest risk factor for linezolid resistance in strains isolated from patients with previous exposure to linezolid is its use in an improper MDR-TB treatment regimen, i.e. a regimen with a reduce number of drugs to which the MTB strain is susceptible.

The rate of linezolid resistance varies considerably in the previously reported studies on MDR MTB clinical isolates – 5,5% – 33.3% [10–14]. In our study the frequency of the MTB resistance to linezolid is mostly in the middle of the reported range (23,1%). These differences in resistance rate across the studies are commonly explained by different types of the enrolled patients, a higher rate in cohorts with higher number of retreatment cases. This is a plausible explanation for the present study as well, in which most of the patients are retreated TB cases.

Overall, the 460T>C mutation in *rplC* was the underlying cause of linezolid resistance in most of our isolates (8 out of 12 resistant cases). This is in line with previously reported data on both *in vitro* and clinical isolates [15]. It was hypothesized that *rplC* resistance is associated with lower biological

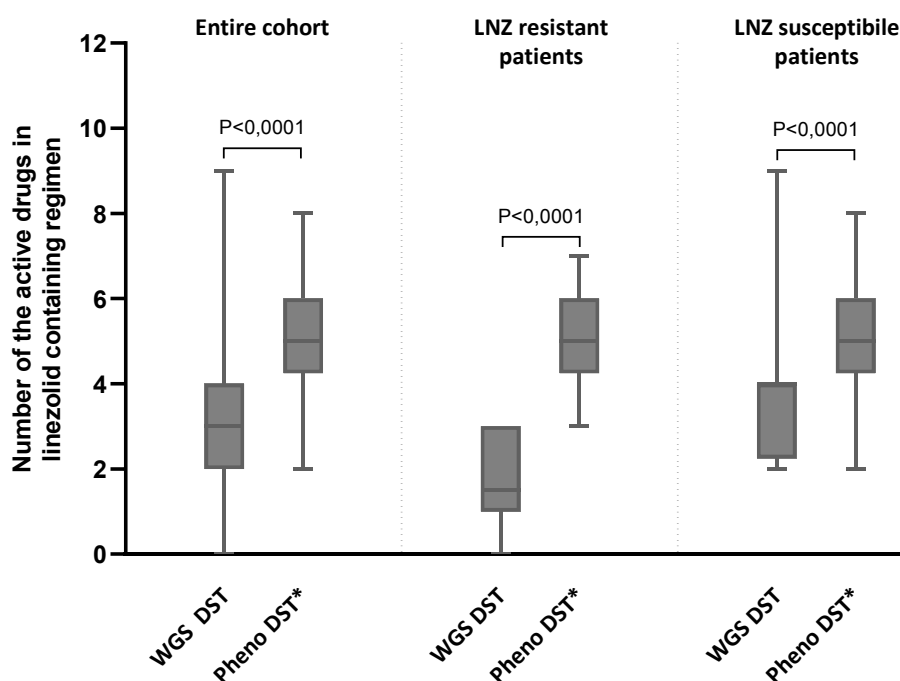


Fig. 3 Numărul de medicamente active în regimul de tratament cu linezolid.

Notă: WGS – secvențierea întregului genom, DST – test fenotipic de sensibilitate la medicamente, LNZ – linezolid, * – numărul de medicamente active în baza testului de sensibilitate fenotipic și a prezumției despre sensibilitatea față de medicamentele netestate.

Fig. 3 Number of active drugs in the linezolid containing regimen.

Note: WGS – whole genome sequencing, DST – phenotypic drug susceptibility test, LNZ – linezolid, * – number of active drugs based on the phenotypic drug susceptibility test and presumption of susceptibility to the not tested drugs.

zistența genotipică la linezolid a tulpinilor de MTB din Republica Moldova este determinată de un set de câteva mutații de tip substituție în genele *rplC* și *rrl*. De asemenea, am constatat că la pacienții cu expunere anterioară la linezolid, administrarea linezolidului într-un regim de tratament suboptim, adică un regim cu un număr redus de medicamente la care tulpina de MTB este sensibilă, reprezintă un important factor de risc pentru rezistența la linezolid.

Rata de rezistență la linezolid variază considerabil în studiile raportate anterior, referitoare la tulpinile MTB izolate de la bolnavii de tuberculoză – 5,5% – 33,3% [10-14]. În studiul nostru, frecvența rezistenței MTB la linezolid se situează aproximativ la mijlocul intervalului raportat (23,1%). De regulă diferențele în ceea ce privește rata de rezistență în studiile publicate sunt explicate prin diferite tipuri de pacienți înrolați, o rată mai mare în cohortele cu un număr mai mare de cazuri de retratament al TB. Aceasta este o explicație plauzibilă și pentru studiul de față, în care majoritatea pacienților sunt cazuri de retratament.

Mutația 460T>C în *rplC* a determinat rezistența la linezolid la majoritatea tulpinilor MTB studiate (8 din 12 cazuri rezistente). Acest lucru este în concordanță cu datele raportate anterior atât pe tulpinile izolate *in vitro*, cât și pe cele izolate de la bolnavii de tuberculoză [15]. A fost emisă ipoteza că mutațiile asociate cu rezistența din gena *rplC* reduc mai puțin adaptabilitatea biologică a MTB decât mutațiile din alte gene, ceea

fitness costs than resistance associated with other genes, that promote transmission of these bacteria in the population and lead to the dominance of these resistant mechanism in various settings [14].

In previously reported sets of MTB isolates, resistant mutations in the *rrl* gene are less frequent but a bit more diverse than those in *rplC* [15]. This finding was observed in our study as well. Four strains from present cohort had resistant mutations in *rrl* gene. Three of the observed *rrl* resistant mutations (2814G>A, 2746G>A, 2270G>T) are among the most commonly reported in the literature while the other one 2810A>C is much rare being described particularly in patient with MDR-TB treatment failure [11]. Three other *rrl* mutations (219G>C, 2434T>C, 2691A>T) identified in our MTB isolates has not been previously described to be associated with linezolid resistance as well they were not described in susceptible strains. Further experiments would be needed to establish the potential role of these mutations in conferring linezolid resistance.

One of our phenotypically resistant strains did not harbor any mutation in *rplC* or *rrl*. Several previous studies have been reported such type of strains as well [16]. Detection of other non-ribosomal genetic targets of linezolid resistance in such strains should be aimed by further studies. It seems plausible to assess the cellular changes that negatively influence cell permeability for antimicrobial agents, particularly changes in efflux pumps function and cell wall thickness [17].

ce contribuie la răspândirea mai eficientă a acestor tulpini în populație [14].

Studiile anterioare raportează că mutațiile rezistente în gena *rrl* sunt mai puțin frecvente, dar ceva mai diverse față de cele din *rplC* [15]. Acest fapt a fost observat și în studiul nostru. Patru tulpini din cohorta analizată au prezentat mutații rezistente în gena *rrl*. Trei dintre mutațiile rezistente *rrl* observate (2814G>A, 2746G>A, 2270G>T) se numără printre cele mai frecvent raportate în literatură, în timp ce cea de a patra, 2810A>C, este mult mai rară, fiind descrisă în special la pacienți TB-MDR cu eșec terapeutic [11]. Alte trei mutații din *rrl* (219G>C, 2434T>C, 2691A>T) identificate la tulpinile de MTB nu au fost descrise anterior ca fiind asociate cu rezistența la linezolid și, de asemenea, nu au fost descrise nici la tulpinile sensibile. Pentru a stabili rolul potențial al acestor mutații în conferirea rezistenței la linezolid sunt necesare studii suplimentare.

Una dintre tulpinile MTB analizate în studiul dat, deși avea rezistență fenotipică nu a prezentat nicio mutație în *rplC* sau *rrl*. Anterior astfel de tulpini au fost, de asemenea, raportate [16]. Rezistența acestor tulpini ar putea fi legată de alte ținte genetice non-ribosomale. În acest sens pare plauzibilă evaluarea modificărilor celulare care influențează negativ permeabilitatea celulară pentru agenții antimicrobieni, în special modificările funcției pompelor de eflux și grosimea peretelui celular [17].

Nivelurile CMI ale linezolidului raportate în studiile anterioare pe tulpini de MTB cu rezistență la linezolid și mutații în genele *rplC* și *rrl*, variază comparativ cu concentrația critică mai mult de 4 – 32 de ori și 8 – 50 de ori, corespunzător, [15]. În studiul realizat nu a fost posibil de a evalua CMI exactă pentru tulpinile rezistente. Cea mai mare concentrație inhibitorie testată la linezolid (2,0 mg/l), este de două ori mai mare decât concentrația critică recomandată pentru testarea de rutină, iar în cazul tulpinilor cu mutații în *rplC* și *rrl* această concentrație nu a inhibat creșterea tulpinilor rezistente. Aceasta confirmă raționalitatea utilizării concentrației critice aplicate în mod curent pentru evaluarea fenotipică a rezistenței la linezolid în practica LNRM.

În studiul realizat genotipul dominant în rândul tulpinilor rezistente la linezolid a fost Beijing (în 7 tulpini din 12). Cu toate acestea, asocierea raportată anterior între genotipul Beijing și rezistența la linezolid [18] nu a fost confirmată în cohorta noastră. Acest lucru ar putea fi cauzat de numărul redus de cazuri în cohorta studiată. În cadrul unui studiu epidemiologic recent la nivelul întregii țări, cu utilizarea WGS, s-a demonstrat rolul tot mai important al genotipului Beijing în răspândirea TB-MDR în Moldova [19]. Având în vedere acest lucru, precum și intensificarea considerabilă a utilizării linezolidului, ar trebui adoptată o atitudine de farmacovigilență sporită în legătură cu linezolidul.

Printre factorii de risc clinici asociați cu rezistența la linezolid, în literatură au fost raportați expunerea anterioară la linezolid și procentul de afectare pulmonară [20]. În cohorta noastră de pacienți expuși anterior la linezolid, cel mai important factor de risc asociat cu rezistența la linezolid a fost numărul de medicamente active din schema de tratament a tuberculozei. Ghidurile actuale privind tratamentul TB-MDR

The previously reported linezolid MIC levels in MTB strains with *rplC* and *rrl* associated resistance range largely between 4 to 32 fold and from 8 to 50 fold, correspondingly [15]. In our study we have not had the possibility to assess the MICs of the resistant strains. In the highest tested inhibitory concentration of linezolid (2,0 mg/l), which is double higher than that recommended breakpoint for the routine assessment, the growth of all strains with mutations in *rplC* and *rrl* were not inhibited. These data confirmed the rationality of the currently use breakpoint for the phenotypical assessment of linezolid resistance in the routine practice of LNRM.

The dominant genotype among the linezolid resistance strains in our study was Beijing (in 7 strains out of 12). However the previously reported association between Beijing genotype and linezolid resistance [18] was not confirmed in our cohort. That could be caused by a reduce number of observations in our cohort. Nevertheless a in recent country wide epidemiological study with use of WGS, it have been shown the increasing role of the Beijing genotype in driving the MDR-TB epidemic in Moldova [19]. Considering that, as well the considerable scaling up in use of linezolid, an increase pharmacovigilance attitude in relation to linezolid should be adopted.

Among clinical risk factors associated with linezolid resistance prior linezolid exposure and percent lung involvement were reported [20]. In our cohort of patients previously exposed to linezolid the most important risk factor associated with linezolid resistance was the number of the active drugs in the TB treatment regimen. Current guidelines on MDR-TB treatment recommend having 4 or 5 active drugs as part of the treatment regimen [21, 22]. The idea behind combination of multiple drugs in treatment of TB disease is to avoid monotherapy and by that to prevent selection of MTB strains resistant to a certain TB drug. Unfortunately, due to lack of tools for the assessment of DST for some of the MDR-TB drugs (e.g. linezolid, bedaquiline, delamanid, carbapenems, clofazimine) during the study period or unavailability and shortages of certain MDR-TB drugs the number of the drugs included in the treatment regimens of the patients from our cohort was frequently suboptimal. It should be acknowledge that this is a sad aspect of the MDR-TB management in other high MDR-TB burden settings in Eastern Europe as well [6]. However, use of an inefficient drug regimen (with not enough active drugs) could also happen in high income setting at least during the initial phase of the MDR-TB treatment, before phenotypic DST results become available. That because diagnostic tools for rapid assessment of susceptibility (as those based on the detection of genetic markers of resistance) to majority of the MDR-TB drugs form WHO drug group A and B are unavailable even in high income settings [23]. All these argue the need of strengthening current DST capacities and drug availability.

Our study has several unavoidable limitations. Due to it retrospective design and technical limitations we were able to include into the study only a part of the cases with the linezolid exposure registered during the study period. As well the clinical characteristics of the study cases were collected as part of routine clinical care and not originally obtained for the purpose of this study. Therefore, we had to accept the bias

recomandă includerea în schema de tratament 4 sau 5 antituberculoase cu eficacitate demonstrată (medicamente active) [21, 22]. Ideea care stă la baza combinării mai multor medicamente în tratamentul tuberculozei este de a evita monoterapia și, prin aceasta, de a preveni selecția tulpinilor de MTB rezistente față de un anumit medicament. Din nefericire, din cauza lipsei capacităților de testare în mod curent a sensibilității pentru unele dintre medicamentele pentru TB-MDR (de exemplu, linezolid, bedaquilină, delamanid, carbapenem, clofazimină) sau lipsei anumitor medicamente pentru tratamentul TB-MDR, numărul de medicamente incluse în regimurile de tratament ale pacienților din cohorta noastră a fost în multe cazuri suboptimal, fapt care a contribuit la apariția rezistenței față de linezolid. De menționat că acesta este un aspect trist al managementului TB-MDR și în alte regiuni cu povară înaltă de TB-MDR din Europa de Est [6]. Cu toate acestea, utilizarea unui regim medicamentos ineficient (cu un număr insuficient de medicamente active) ar putea avea loc și în regiunile cu nivel ridicat de trai, cel puțin în timpul fazei inițiale a tratamentului TB-MDR, înainte ca rezultatele DST fenotipice să fie disponibile. Acest lucru se datorează faptului că evaluarea rapidă a sensibilității (cum ar fi prin teste bazate pe detectarea markerilor genetici de rezistență) pentru medicamentele din grupele A și B de medicamente anti TB-MDR nu sunt disponibile nici în regiunile cu nivel ridicat de trai [23]. Toate acestea argumentează necesitatea de a îmbunătăți capacitățile actuale de DST și disponibilitatea a medicamentelor.

Rezultate prezentului studiu au câteva limitări inevitabile. Din cauza designului retrospectiv și a limitărilor tehnice, am putut include în cercetare doar o parte din cazurile TB-MDR cu expunere la linezolid înregistrate în perioada de studiu. De asemenea, caracteristicile clinice ale cazurilor studiate au fost colectate în cadrul prestării asistenței medicale de rutină și nu au fost obținute primar în scopul acestui studiu. Prin urmare, trebuie admis un posibil grad de inexactitate în descrierea caracteristicilor clinice ale cohortei precum și în generalizarea rezultatelor studiului. Cu toate acestea, suntem încrezători că strategia noastră de identificare a cazurilor eligibile a fost suficient de riguroasă pentru a evita excluderea unor observații extreme importante și că parametrii-cheie, precum durata expunerii la linezolid sau numărul de medicamente active din regimul de tratament, au fost bine documentate, asigurând caracterul robust al rezultatelor obținute.

Concluzii

1. Rezistența la linezolid este frecventă la pacienții tratați anterior cu acest medicament, spectrul determinantelor genotipice ale rezistenței fiind dominat de un set de mutații în genele *rplC* și *rrl*.

2. Număr suboptimal de medicamente active în schema de tratament cu linezolid crește șansele de apariție a rezistenței tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis* la acest medicament.

Declarație de conflict de interese

Autorii declară lipsa oricărui conflict financiar sau nefinanciar.

when describing clinical features of the cohort and generalized the results. However, we are confident that our strategy to identify eligible cases was sufficient rigorous to avoid exclusion of important outliers and that the key parameters (e.g. duration of linezolid exposure or number of the active drugs in the treatment regimen) were well documented and ensure the sufficient robustness of the obtained results.

Conclusions

1. Resistance to linezolid is a common feature in patients previously treated with this drug, the spectrum of genotypic resistance being dominated by a few genetic determinants in *rplC* and *rrl*.

2. A reduce number of the active drugs in the LNZ containing treatment regimen increase the chance of LNZ resistance.

Declaration of conflict of interest

Authors declare lack of any financial or non-financial conflict.

Authors' contribution

EC, DC conceived the study. NC, EC performed minimum inhibitory concentration determination. EC, MM analyzed whole genome sequencing data. EC, DC performed statistical analysis. EC, DC, JH, MM, VC drafted and revised critically the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgment

The authors acknowledge the contribution of CARE Consortium funded by the European Union's Horizon 2020 program and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Contribuția autorilor

EC, DC au conceput studiul. NC, EC au efectuat determinarea concentrației minime inhibitorii. EC, MM au analizat datele de secvențiere a întregului genom. EC, DC au efectuat analiza statistică. EC, DC, JH, MM, VC au redactat și au revizuit critic manuscrisul. Toți autorii au citit și au aprobat versiunea finală a manuscrisului.

Mulțumiri

Autorii mulțumesc Consorțiului CARE, finanțat de programul Orizont 2020 al Uniunii Europene și Ministerului de Științe și Învățământ Superior al Federației Ruse.

Referințe / references

- WHO. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization, <http://apps.who.int/bookorders>. (2020, accessed 25 December 2020).
- Lange C., Aarnoutse R.E., Alffenaar J.W.C., Bothamley G., Brinkmann F., Costa J., Chesov D., van Crevel R., Dedicoat M., Dominguez J., Duarte R., Grobbel H.P., Günther G., Guglielmetti L., Heyckendorf J., Kay A.W., Kirakosyan O., Kirk O., Koczulla R.A., Kudriashov G.G., Kuksa L., van Leth F., Magis-Escurra C., Mandalakas A.M., Molina-Moya B., Peloquin C.A., Reimann M., Rumetshofer R., Schaaf H.S., Schön T., Tiberi S., Valda J., Yablonskii P.K., Dheda K. Management of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2019; 23: 645-662.
- WHO consolidated guidelines on tuberculosis. World Health Organization, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32603040> (2020, accessed 2 April 2021).
- Wasserman S., Louw G., Ramangoela L., Barber G., Hayes C., Omar S.V., Maartens G., Barry C., III, Song T., Meintjes G. Linezolid resistance in patients with drug-resistant TB and treatment failure in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 2377.
- Wasserman S., Meintjes G., Maartens G. Linezolid in the treatment of drug-resistant tuberculosis: the challenge of its narrow therapeutic index. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14: 901-915.
- Butov D., Lange C., Heyckendorf J., Kalmykova I., Butova T., Borovok N., Novokhatskaya M., Chesov D. Multidrug-resistant tuberculosis in the Kharkiv Region, Ukraine. *Int J Tuberc Lung Dis* 2020; 24: 485-491.
- Stinson K.W., Eisenach K., Kayes S., Matsumoto M., Siddiqi S., Nakashima S., Hashizume H., Timm J., Morrissey A. *Mycobacteriology Laboratory Manual*. 2014.
- Kohl T.A., Utpatel C., Schleusener V., Filippo M.R. De, Beckert P., Cirillo D.M., Niemann S. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ* 2018; 6: e5895.
- Merker M., Kohl T.A., Barilar I., Andres S., Fowler P.W., Chryssanthou E., Ångeby K., Jureen P., Moradigaravand D., Parkhill J., Peacock S.J., Schön T., Maurer F.P., Walker T., Köser C., Niemann S. Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Genome Med* 2020 121 2020; 12: 1-8.
- Zimenkov D. V., Nosova E.Y., Kulagina E. V., Antonova O. V., Arslanbaeva L.R., Isakova A.I., Krylova L.Y., Peretokina I. V., Makarova M. V., Safonova S.G., Borisov S.E., Gryadunov D.A. Examination of bedaquiline- and linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 1901-1906.
- Wasserman S., Louw G., Ramangoela L., Barber G., Hayes C., Omar S., Maartens G., Barry C., Song T., Meintjes G. Linezolid resistance in patients with drug-resistant TB and treatment failure in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 2377-2384.
- Pang Y., Zong Z., Huo F., Jing W., Ma Y., Dong L., Li Y., Zhao L., Fu Y., Huang H. In Vitro Drug Susceptibility of Bedaquiline, Delamanid, Linezolid, Clofazimine, Moxifloxacin, and Gatifloxacin against Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Beijing, China. *Antimicrob Agents Chemother*; 61. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1128/AAC.00900-17.
- Zheng H., He W., Jiao W., Xia H., Sun L., Wang S., Xiao J., Ou X., Zhao Y., Shen A. Molecular characterization of multidrug-resistant tuberculosis against levofloxacin, moxifloxacin, bedaquiline, linezolid, clofazimine, and delamanid in southwest of China. *BMC Infect Dis*; 21. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1186/S12879-021-06024-8.
- Du J., Gao J., Yu Y., Li Q., Bai G., Shu W., Gao M., Liu Y., Wang L., Wang Y., Xue Z., Huo F., Li L., Pang Y. Low Rate of Acquired Linezolid Resistance in Multidrug-Resistant Tuberculosis Treated With Bedaquiline-Linezolid Combination. *Front Microbiol* 2021; 12: 655653.
- Kadura S., King N., Nakhoul M., Zhu H., Theron G., Köser C.U., Farhat M. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 2031-2043.
- Zhang S., Chen J., Cui P., Shi W., Shi X., Niu H., Chan D., Yew W., Zhang W., Zhang Y. *Mycobacterium tuberculosis* Mutations Associated with Reduced Susceptibility to Linezolid. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 2542-2544.
- Sharma D., Bisht D. M. tuberculosis Hypothetical Proteins and Proteins of Unknown Function: Hope for Exploring Novel Resistance Mechanisms as well as Future Target of Drug Resistance. *Front Microbiol* 2017; 8: 465.
- Zhang Z., Pang Y., Wang Y., Liu C., Zhao Y. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with linezolid resistance in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in China. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 43: 231-235.
- Yang C., Sobkowiak B., Naidu V., Codreanu A., Ciobanu N., Gunasekera K.S., Chitwood M.H., Alexandru S., Bivol S., Russi M., Havumaki J., Cudahy P., Fosburgh H., Allender C.J., Centner H., Engelthaler D.M., Menzies N.A., Warren J.L., Crudu V., Colijn C., Cohen T. Phylogeography and transmission of *M. tuberculosis* in Moldova. *medRxiv* 2021; 2021.06.30.21259748.
- Tornheim J., Intini E., Gupta A., Udhwadia Z. Clinical features associated with linezolid resistance among multidrug resistant tuberculosis patients at a tertiary care hospital in Mumbai, India. *J Clin Tuberc other Mycobact Dis* 2020; 20: 100175.
- WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis, Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240007048> (accessed 14 July 2020).
- Nahid P., Mase S.R., Migliori G.B., Sotgiu G., Bothamley G.H., Wortham J.M., et al. Treatment of drug-resistant tuberculosis an official ATS/CDC/ERS/IDSA clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 200: E93-E142.
- Farooq H., Cirillo D., Hillemann D., Wyllie D., van der Werf M., Ködmön C., Nikolayevskyy V. Limited Capability for Testing *Mycobacterium tuberculosis* for Susceptibility to New Drugs. *Emerg Infect Dis* 2021; 27: 985-987.