

19й вебинар  
Виртуального  
медицинского  
консилиума

9.12.2022

# Как интерпретировать расхождение результатов генотипических и фенотипических ТЛЧ для диагностики РУ- ТБ



European Laboratory  
Initiative 2022

Д-р Claudio Köser (cuk21@cam.ac.uk)

- Выражаю благодарность д-ру Soudeh Ehsani.
- Ключевые термины и сокращения во всей презентации обозначены подчеркиванием.
- Пожалуйста, не стесняйтесь задавать вопросы (сегодня или позже по электронной почте).

- Внедрение генотипических тестов на лекарственную чувствительность (гТЛЧ) произвело революцию в тестировании ЛЧ, однако это неизбежно привело к появлению определенного числа дискордантных результатов, что ранее было редкостью, поскольку клиницист обычно получал только один результат фенотипического ТЛЧ (фТЛЧ).
- Мы обсудим различные типы расхождений между:
  - результатами гТЛЧ и фТЛЧ;
  - результатами гТЛЧ (для одного и того же или разных типов исследований);
  - различных результатов фТЛЧ (в основном для автоматизированной системы индикаторных пробирок для мониторинга роста микобактерий ВАСТЕС (MGIT), поскольку это наиболее широко используемый метод).

- Общие сведения о лекарственно-устойчивом ТБ, фТЛЧ и гТЛЧ.
- Обсуждение трех основных классов ошибок, которые могут быть вызваны человеческим фактором или ограничениями, присущими определенному методу исследования:
  - ◦ случайные ошибки;
  - ◦ систематические ошибки;
  - ◦ пороговое значение.

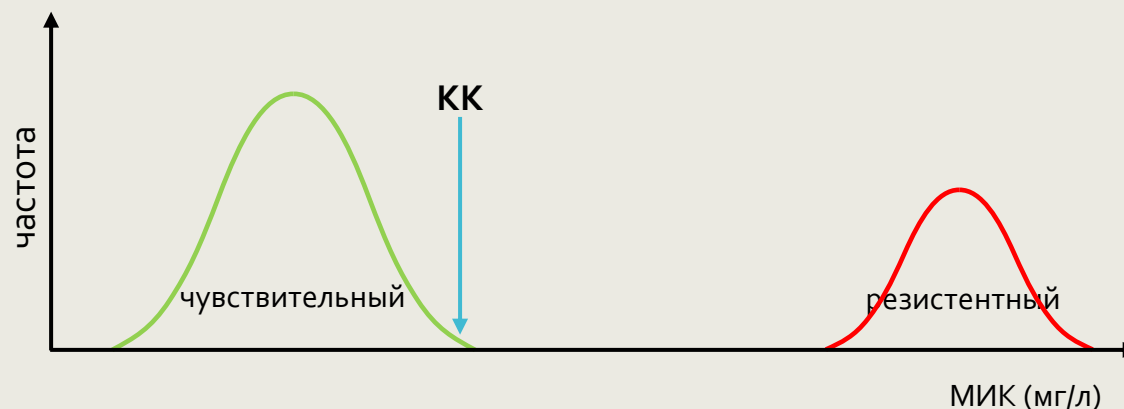
# Предпосылки: лекарственно-устойчивый ТБ

- Отмечают четыре основных класса лекарственной устойчивости:
  - ТБ с устойчивостью возбудителя к изониазиду, но сохраненной лекарственной чувствительностью к рифампицину: 8% случаев ТБ во всем мире.
  - Рифампицин-устойчивый (РУ) ТБ или ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) - лекарственной устойчивостью возбудителя как к рифампицину, так и к изониазиду: 3-4% новых и 18-21% ранее леченных случаев во всем мире. Показатели значительно выше в странах бывшего Советского Союза (например 38% новых и 69% ранее леченных случаев в Российской Федерации).
  - ТБ с предширокой лекарственной устойчивостью (пре-ШЛУ): МЛУ/РУ-ТБ и устойчивостью возбудителя к левофлоксацину или моксифлоксацину.
  - ТБ с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ): пре-ШЛУ и устойчивостью возбудителя к бедаквилину или линезолиду.

- Наиболее широко используемые в Европейском регионе типы одобренных ВОЗ исследований:
  - Cepheid Xpert MTB/RIF (Xpert) или Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra) - для рифампицина (*rpoB*).
  - Hain Lifescience GenoType MTBDRplus VER 2.0 (ЛРА-ППР) - для этионамида/протионамида (*inhA*), изониазида (*inhA* и *katG*) и рифампицина (*rpoB*).
  - Hain Lifescience GenoType MTBDRsl VER 2.0 (ЛРА-ПВР) - для фторхинолонов (*gyrA* и *gyrB*) и инъекционных препаратов второго ряда (*eis* и *rrs*).
  - Cepheid Xpert MTB/XDR (XDR) - для этионамида/протионамида (*inhA*), изониазида (*ahpC*, *fabG1*, *inhA* и *katG*), фторхинолонов (*gyrA* и *gyrB*) и инъекционных препаратов второго ряда (*eis* и *rrs*).

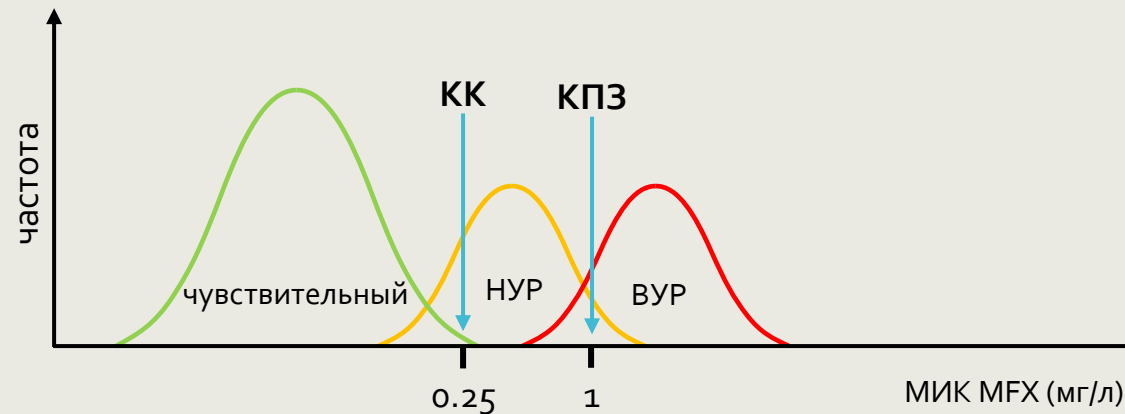
# Как работает фТЛЧ?

- Необходима положительная культура, которая подвергается воздействию изучаемого препарата.
- Если минимальная ингибирующая концентрация (МИК) выше критической концентрации (КК), то штамм является резистентным.
- На практике в большинстве лабораторий мира проверяется только КК.



# Как работает фТЛЧ?

- Лекарственная устойчивость к моксифлоксацину дополнительно подразделяется на низкий уровень резистентности (НУР) и высокий уровень резистентности (ВУР) с использованием клинического пограничного значения (КПЗ). НУР и ВУР являются критерием исключения для более короткого режима лечения, содержащего моксифлоксацин, но моксифлоксацин в высоких дозах может быть использован как часть длительного индивидуализированного режима лечения для штаммов с НУР.



- Генотипически лекарственная устойчивость к изониазиду также подразделяется на НУР и ВУР, но эквивалентное КПЗ для фТЛЧ не было одобрено ВОЗ.



# Как мутации обеспечивают устойчивость?

- Существует множество механизмов (например снижение активации или повышение инактивации препарата).
- Устойчивость считается клинически значимой, если мутирует не менее 1% бактериальной популяции (10% для пиразинамида) - критическая доля.
- Гетерорезистентность возникает, если частота резистентной популяции составляет  $\geq 1\%$ , но ниже 100%, что может быть обусловлено:
  - приобретением устойчивости к лекарственным препаратам изначально лекарственно чувствительным штаммом;
  - смешанной инфекцией, вызванной штаммами с различной чувствительностью к одному и тому же препарату.

# Как работает гТЛЧ?

- Выделяется и амплифицируется ДНК. Затем с помощью различных методов выявляются мутации или предполагается их наличие.
- В отличие от фТЛЧ, гТЛЧ можно проводить непосредственно из первичных диагностических образцов при условии достаточно высокой степени обсемененности (т.е. обычно это мазок-положительные образцы).

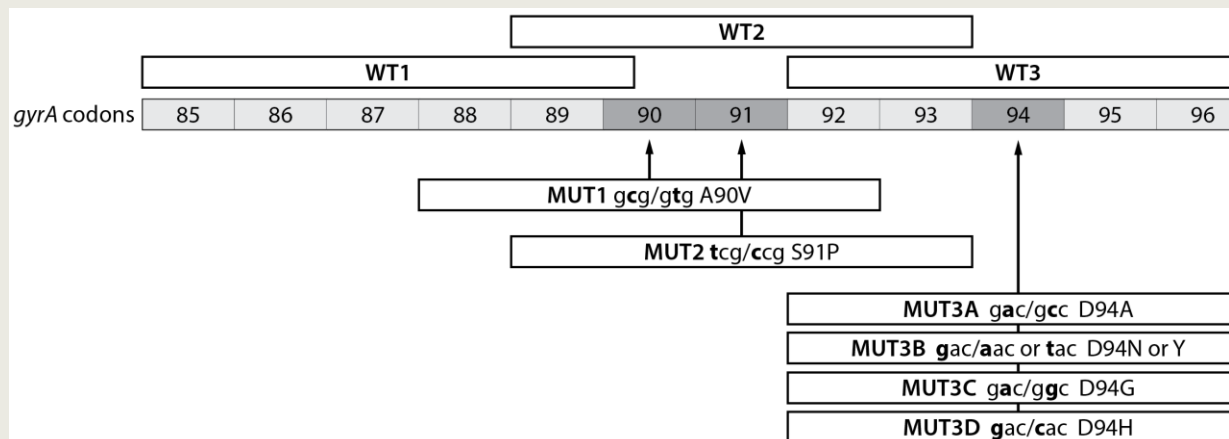
# Как генетические тесты на лекарственную чувствительность позволяют предположить или обнаружить мутации, вызывающие лекарственную устойчивость?

Line	LPA-ППР
1	Conjugate Control
2	Amplification Control
3	<i>M. tuberculosis</i> complex TUB
4	<i>rpoB</i> Locus Control <i>rpoB</i>
5	<i>rpoB</i> wild type probe 1 <i>rpoB</i> WT1
6	<i>rpoB</i> wild type probe 2 <i>rpoB</i> WT2
7	<i>rpoB</i> wild type probe 3 <i>rpoB</i> WT3
8	<i>rpoB</i> wild type probe 4 <i>rpoB</i> WT4
9	<i>rpoB</i> wild type probe 5 <i>rpoB</i> WT5
10	<i>rpoB</i> wild type probe 6 <i>rpoB</i> WT6
11	<i>rpoB</i> wild type probe 7 <i>rpoB</i> WT7
12	<i>rpoB</i> wild type probe 8 <i>rpoB</i> WT8
13	<i>rpoB</i> mutation probe 1 <i>rpoB</i> MUT1
14	<i>rpoB</i> mutation probe 2A <i>rpoB</i> MUT2A
15	<i>rpoB</i> mutation probe 2B <i>rpoB</i> MUT2B
16	<i>rpoB</i> mutation probe 3 <i>rpoB</i> MUT3
17	<i>katG</i> Locus Control <i>katG</i>
18	<i>katG</i> wild type probe <i>katG</i> WT
19	<i>katG</i> mutation probe 1 <i>katG</i> MUT1
20	<i>katG</i> mutation probe 2 <i>katG</i> MUT2
21	<i>inhA</i> Locus Control <i>inhA</i>
22	<i>inhA</i> wild type probe 1 <i>inhA</i> WT1
23	<i>inhA</i> wild type probe 2 <i>inhA</i> WT2
24	<i>inhA</i> mutation probe 1 <i>inhA</i> MUT1
25	<i>inhA</i> mutation probe 2 <i>inhA</i> MUT2
26	<i>inhA</i> mutation probe 3A <i>inhA</i> MUT3A
27	<i>inhA</i> mutation probe 3B <i>inhA</i> MUT3B
	Colored marker

Line	LPA-ПВР
1	Conjugate Control
2	Amplification Control
3	<i>M. tuberculosis</i> complex TUB
4	<i>gyrA</i> Locus Control <i>gyrA</i>
5	<i>gyrA</i> wild type probe 1 <i>gyrA</i> WT1
6	<i>gyrA</i> wild type probe 2 <i>gyrA</i> WT2
7	<i>gyrA</i> wild type probe 3 <i>gyrA</i> WT3
8	<i>gyrA</i> mutation probe 1 <i>gyrA</i> MUT1
9	<i>gyrA</i> mutation probe 2 <i>gyrA</i> MUT2
10	<i>gyrA</i> mutation probe 3A <i>gyrA</i> MUT3A
11	<i>gyrA</i> mutation probe 3B <i>gyrA</i> MUT3B
12	<i>gyrA</i> mutation probe 3C <i>gyrA</i> MUT3C
13	<i>gyrA</i> mutation probe 3D <i>gyrA</i> MUT3D
14	<i>gyrB</i> Locus Control <i>gyrB</i>
15	<i>gyrB</i> wild type probe <i>gyrB</i> WT
16	<i>gyrB</i> mutation probe 1 <i>gyrB</i> MUT1
17	<i>gyrB</i> mutation probe 2 <i>gyrB</i> MUT2
18	<i>rrs</i> Locus Control <i>rrs</i>
19	<i>rrs</i> wild type probe 1 <i>rrs</i> WT1
20	<i>rrs</i> wild type probe 2 <i>rrs</i> WT2
21	<i>rrs</i> mutation probe 1 <i>rrs</i> MUT1
22	<i>rrs</i> mutation probe 2 <i>rrs</i> MUT2
23	<i>eis</i> Locus Control <i>eis</i>
24	<i>eis</i> wild type probe 1 <i>eis</i> WT1
25	<i>eis</i> wild type probe 2 <i>eis</i> WT2
26	<i>eis</i> wild type probe 3 <i>eis</i> WT3
27	<i>eis</i> mutation probe 1 <i>eis</i> MUT1
	Colored marker

# Как генетические тесты на лекарственную чувствительность позволяют предположить или обнаружить мутации, вызывающие лекарственную устойчивость?

- Мутантные (MUT) зонды непосредственно выявляют мутации, вызывающие лекарственную устойчивость, связываясь с этими мутациями.
- Зонды дикого типа (WT) косвенно указывают на наличие мутации, определяющей лекарственную устойчивость, поскольку не связываются с последовательностью ДТ, но другие нейтральные мутации, не вызывающие устойчивости, также могут препятствовать связыванию зондов дикого типа, что приводит к систематическим ложным результатам лекарственной устойчивости.
- Метод гибридизации с типоспецифическими зондами (LPA) использует оба типа зондов (MUT и WT), как показано здесь для гена *gyrA* при проведении LPA-ПВР:



# Причины возникновения дискордантных результатов

- Ошибки, связанные с человеческим фактором
- Ограничения, присущие методам исследования




# Человеческие ошибки можно свести к минимуму с помощью культуры непрерывного повышения качества без поиска виноватых

- Человеческие ошибки невозможно полностью устранить, но их можно свести к минимуму путем внедрения и непрерывного контроля соблюдения ряда мер:
  - осуществление организационных и технических усовершенствований путем внедрения систем управления качеством и обеспечения качества;
  - внедрение культуры, опирающейся на принцип отсутствия поиска виновного, учитывая, что рабочие проблемы часто бывают сложными и обычно не являются виной одного человека;
  - понимание того, что обучение на ошибках - это непрерывный процесс.


# Человеческие ошибки можно свести к минимуму за счет культуры непрерывного повышения качества без поиска виноватых

RESEARCH ARTICLE

## Introduction of quality management in a National Reference Laboratory in Germany

Susanne Homolka<sup>1,2</sup><sup>\*</sup>, Julia Zallet<sup>1,2</sup><sup>☉</sup>, Heidi Albert<sup>3</sup><sup>☉</sup>, Anne-Kathrin Witt<sup>1</sup>, Katharina Kranzer<sup>1,4</sup>

**1** National Reference Laboratory for Mycobacteria, Research Center Borstel, Borstel, Germany, **2** Molecular and Experimental Mycobacteriology, Research Center Borstel, Borstel, Germany, **3** Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND) South Africa, Cape Town, South Africa, **4** Clinical Research Department, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, England, United Kingdom

 These authors contributed equally to this work.

\* [shomolka@fz-borstel.de](mailto:shomolka@fz-borstel.de)

**Citation:** Homolka S, Zallet J, Albert H, Witt A-K, Kranzer K (2019) Introduction of quality management in a National Reference Laboratory in Germany. PLoS ONE 14(10): e0222925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222925>

# Каковы три основных класса ошибок?

INT J TUBERC LUNG DIS 25(10):791–794  
© 2021 The Union  
<http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.21.0428>

**EDITORIAL**

## Guidance is needed to mitigate the consequences of analytic errors during antimicrobial susceptibility testing for TB

 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Clinical Microbiology®

COMMENTARY



## On the Consequences of Poorly Defined Breakpoints for Rifampin Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex

 Claudio U. Köser,<sup>a</sup> Sophia B. Georghiou,<sup>b</sup> Thomas Schön,<sup>c,d,e</sup> Max Salfinger<sup>f</sup>



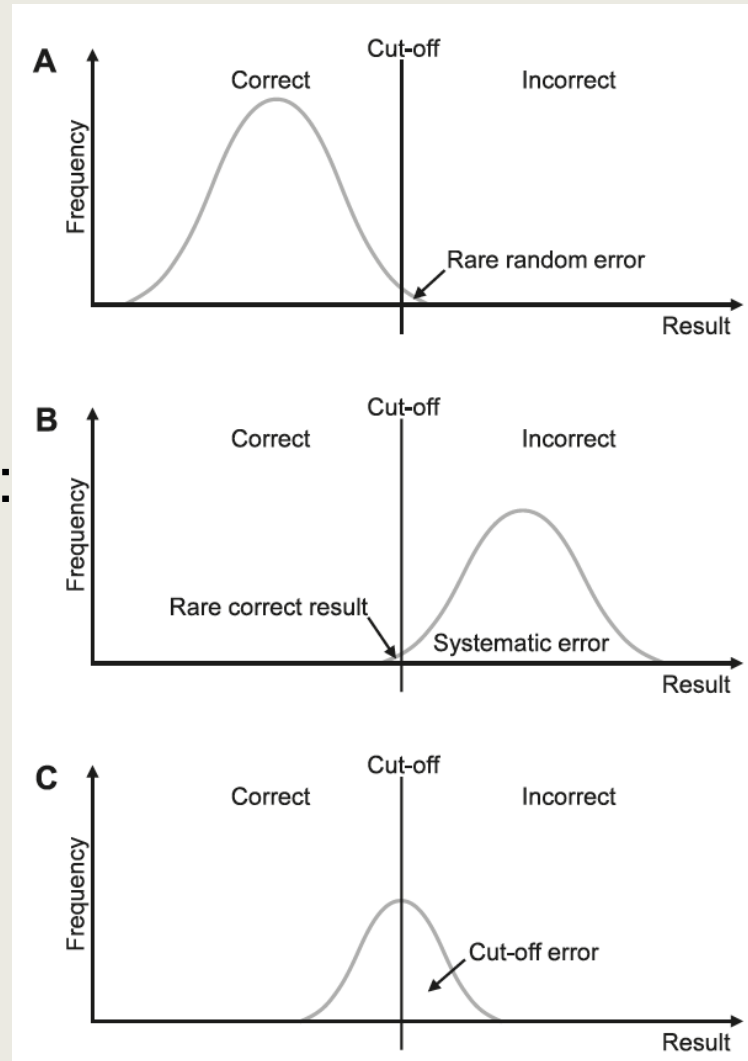
# Каковы три основных класса ошибок?

- Случайные ошибки:

- Систематические ошибки:

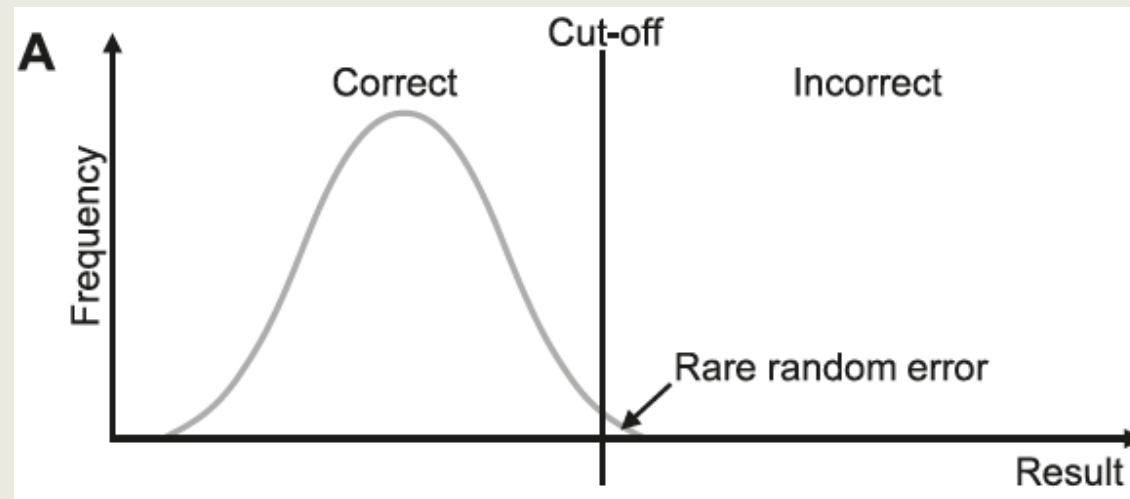
- Ошибки пороговых

- значений:



- Даже проведение ТЛЧ в соответствии с надлежащей лабораторной практикой не исключает возникновения редких случайных ошибок (из-за человеческого фактора, приборов или реагентов) при проведении всех генотипических и фенотипических видов исследований.
- Случайные ошибки возникают даже при использовании надлежащих критериев валидности и приемлемости (например отрицательный и положительный контроли, а также контроль процесса, дающий ожидаемые результаты).
- Поскольку эти ошибки являются случайными, возможно возникновение полного спектра потенциальных ошибок, включая неопределенные, ложночувствительные или ложноустойчивые результаты.

- Поскольку такие ошибки редко возникают при проведении тщательно разработанных исследований с контролем качества, анализ можно просто повторить, используя тот же первичный образец или культуру, с высокой вероятностью получения правильного результата (т.е. действительно случайные ошибки редко возникают повторно).



- Как клиницистов и микробиологов вас, естественно, больше всего интересуют результаты ТЛЧ, показывающие наличие лекарственной устойчивости.
- Однако любые результаты ТЛЧ (да и вообще результаты любого теста) должны интерпретироваться в контексте уровня распространенности (или вероятности/возможности наличия до проведения теста) лекарственной устойчивости, поскольку это существенно влияет на прогностическую ценность положительного результата (ПЦП), которая соответствует вероятности того, что первоначальный результат наличия ЛУ окажется точным.
- $$\text{ПЦП} = \frac{\text{(число истинных резистентных результатов)}}{\text{(число истинных резистентных результатов) + (число ложных резистентных результатов)}}$$

- Давайте изучим влияние распространенности лекарственной устойчивости на ПЦП ТЛЧ, точность которого составляет 99% для 1 000 протестированных штаммов:

Распространенность	Резистентные штаммы	Чувствительные штаммы	Истинные резистентные результаты <sup>1</sup>	Ложные резистентные результаты <sup>2</sup>	ПЦП <sup>3</sup>
0%	0	1 000	0	10	0.0%
1%	10	990	9.9	9.9	50.0%
5%	50	950	49.5	9.5	83.9%
10%	100	900	99	9	91.7%
12%	120	880	118.8	8.8	93.1%
20%	200	800	198	8	96.1%
25%	250	750	247.5	7.5	97.1%

<sup>1</sup> = (резистентные штаммы)\*99%

<sup>2</sup> = (чувствительные штаммы)\*1%

<sup>3</sup> формула на предыдущем слайде.

- Вы можете самостоятельно более подробно изучить данный вопрос на сайте:

<https://www.lri.fr/~mbi/COVID19/bayes.html>:

## ▼ Another way to look at it

Another way to look at the diagram is to note that the main diagonal (0% + 98%) represents those who received a negative result: most were **healthy** (true negatives), but some were **sick** (false negatives). The other diagonal (1% + 1%) represents those who received a positive result: some were **sick** (true positives), but some were **healthy** (false positives).

You can notice that when the prevalence (proportion of sick people) is equal to the inaccuracy of the test (proportion of tests that give an incorrect result, i.e. 100% - accuracy), the proportions of true and false positives become the same (the two rectangles in the **top-left** and **bottom-right** have the same area). This is because a small proportion (the false positives) of a large population (the healthy people) can be the same as a large proportion (the real positives) of a small population (the sick people). The net result is that in this case, if you get a positive result, you have only a 50% chance of being sick! Click  to show such an example (10% prevalence, 90% accuracy).

In the general case, the confidence you can have in the results is calculated as follows:

Probability of being sick if you receive a positive test:  $\frac{\text{cyan}}{\text{orange} + \text{cyan}} = 50\%$

Probability of being healthy if you receive a negative test:  $\frac{\text{green}}{\text{green} + \text{red}} = 100\%$

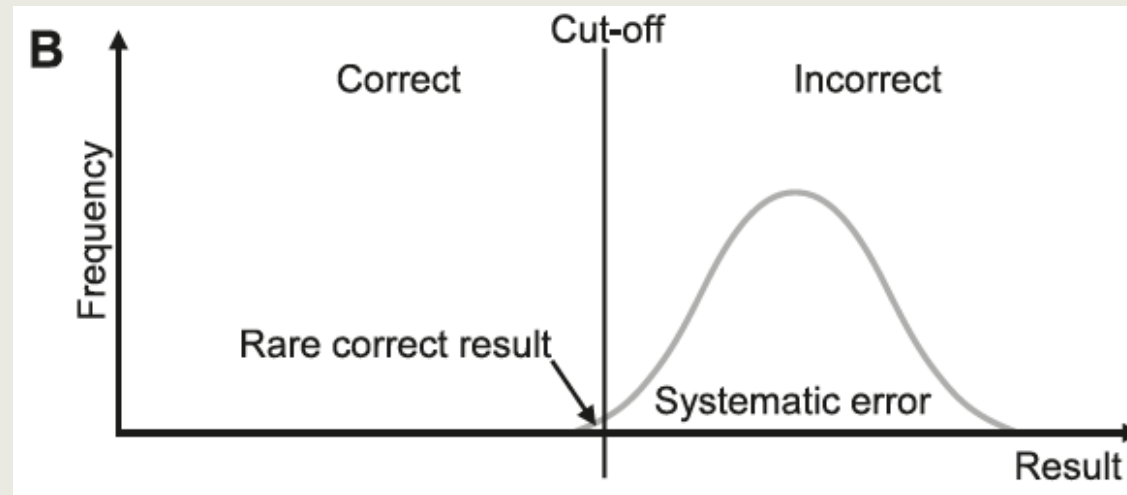
As you can see, this is quite different from the accuracy of the test. Here are the two sliders again to explore how the parameters affect the results:

Prevalance of the disease:  1%; Accuracy of the test:  99%

- Именно поэтому ВОЗ подчеркивает, что лечение МЛУ-ТБ следует начинать только у пациентов с факторами риска МЛУ-ТБ на основании одного результата гТЛЧ, подтверждающего устойчивость возбудителя к рифампицину (т.е. у ранее лечившихся пациентов, включая тех, кто был потерян для последующего наблюдения, больных с рецидивом или неудачей предыдущего лечения; у пациентов без негативации мокроты (с положительным мазком в конце интенсивной фазы); у лиц, находившихся в контакте с больными МЛУ-ТБ; и у любых других групп риска МЛУ-ТБ, выявленных в стране). См.: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1354706/retrieve>
- Важно отметить, что случайный ложнорезистентный результат можно исправить, повторив ТЛЧ тем же методом, так как вероятность получения двух последовательных ложнорезистентных результатов невелика.

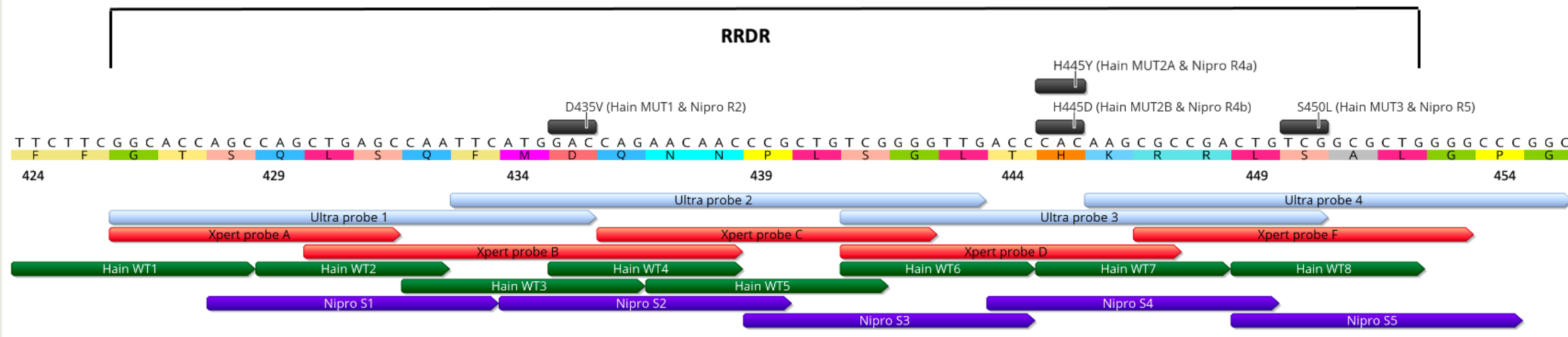
Распространенность	Резистентные штаммы	Чувствительные штаммы	Истинные резистентные результаты <sup>1</sup>	Ложные резистентные результаты <sup>2</sup>	ПЦП <sup>3</sup>
1%	10	990	9.9	9.9	50%
10%	100	900	99	9	91.7%
20%	200	800	198	8	96.1%

- В отличие от редких случайных ошибок, систематические ошибки обусловлены присущими методу или процедуре исследования ограничениями и не могут быть устранены повторным тестированием (т.е. всегда получаются неправильные результаты за исключением редких случаев, когда результат ложно интерпретируется как правильный из-за случайной ошибки).





- Ложночувствительные результаты гТЛЧ:
  - Анализируются не все гены, определяющие резистентность (например Serheid XDR охватывает ген *fabG1* для изониазида, в отличие от LPA-ППР).
  - Даже если ген проанализирован, разные виды исследований охватывают немного отличные участки этого гена, как показано здесь для области, определяющей лекарственную устойчивость к рифампицину (ООУР):



- Ложночувствительные результаты гТЛЧ:

Частота обуславливающей лекарственную устойчивость мутации в образце ниже предела обнаружения (ПО) исследования, но  $\geq 1\%$ , критическая доля, используемая для фТЛЧ. Точные значения ПО для гетерорезистентности зависят от мутации, но приблизительно составляют:

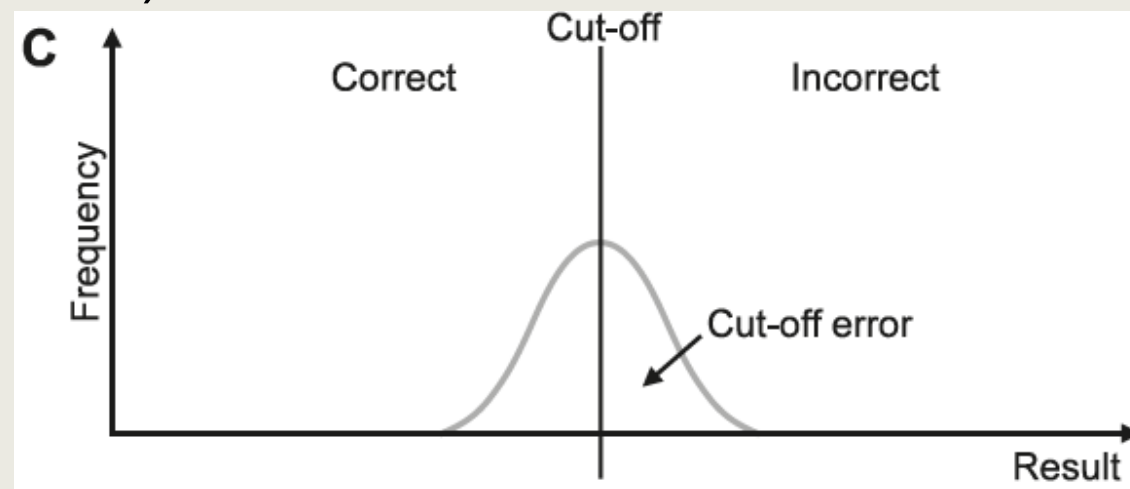
- 20-70% для Cepheid Ultra.
- 5-10% для MUT зондов по сравнению с  $>95\%$  для зондов дикого типа для Hain LPA.

- Ложнорезистентные результаты гТЛЧ:
  - Нейтральные мутации в участках, на которые нацелены зонды дикого типа (т.е. предполагаемые результаты). Как правило, такие мутации являются редкими, но могут встречаться часто на местном уровне относительно частоты возникновения лекарственной устойчивости (например, 7% больных МЛУ-ТБ в Колумбии имеют мутацию, обуславливающую ложный результат резистентности к фторхинолонам).

# Другие факторы возникновения систематических различий

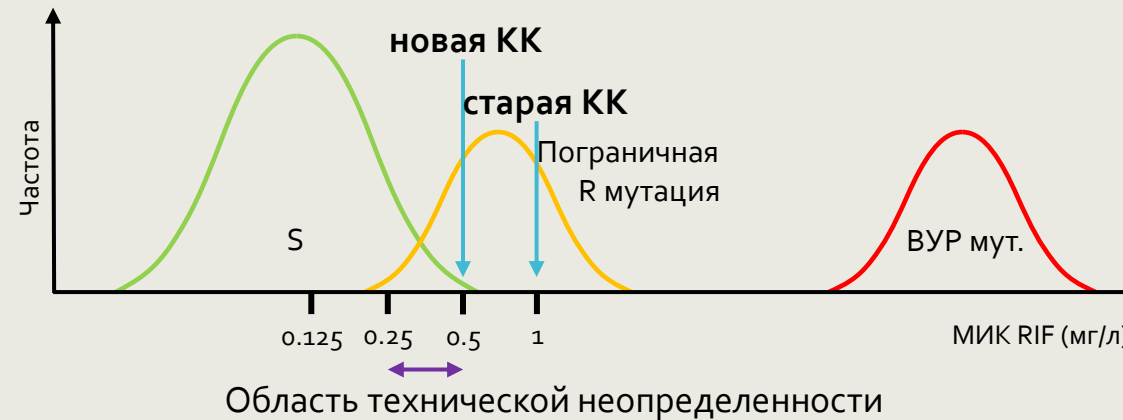
- Культура может быть не репрезентативной для различных штаммов, присутствующих в первичном образце.
- Контаминация чувствительной культуры устойчивым штаммом.

- Данный класс ошибок является систематическим в том смысле, что они возникают только при определенных условиях, определяемых пороговым значением конкретного измеряемого параметра исследования. Однако, в отличие от ранее рассмотренных систематических ошибок, они имеют большой случайный компонент (т.е. существует просто большая вероятность получения неправильного результата, в отличие от почти полной уверенности в случае систематических ошибок).



# Примеры ошибок, связанных с пороговым значением

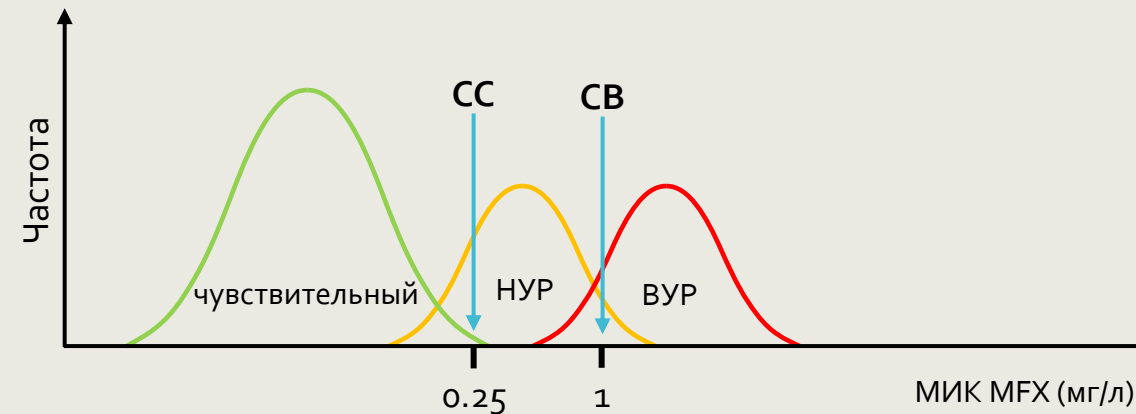
- фТЛЧ не является надежным подтверждающим тестом для пограничных мутаций для рифампицина (*rpoB* L430P, D435Y, H445L, H445N, H445S, L452P и I491F). Поэтому ВОЗ утвердила, что обнаружение этих мутаций методом секвенирования отменяет результат фТЛЧ, показывающий наличие лекарственной чувствительности



Тип мутации	Ошибочно классифицированы как чувствительные при старых КК MGIT	Ошибочно классифицированы как чувствительные при новых КК MGIT
S450 (S531)	0% (95% ДИ 0-1%)	0% (95% ДИ 0-1%)
пограничная RRDR	74% (95% ДИ 67-81%)	53% (95% ДИ 45-61%)
пограничная I491F (I572F)	100% (95% ДИ 69-100%)	80% (95% ДИ 44-97%)

# Примеры ошибок, связанных с пороговым значением

- КК моксифлоксацина не является надежным методом для подтверждения НУР (например, *gyrA* A90V), а КПЗ не является надежным методом для ВУР (например, *gyrA* D94G):



- КК левофлоксацина обеспечивает лучшее разрешение между чувствительными штаммами и мутантами с НУР (например, нередко фенотипический ТЛЧ для *gyrA* A90V показывает устойчивость к левофлоксацину, но лекарственную чувствительность к моксифлоксацину).

- Результаты ТЛЧ в одном учреждении не всегда можно экстраполировать даже на соседнее учреждение, поскольку исследуемые штаммы могут отличаться.
- Создайте систему для быстрого выявления дискордантных результатов и отслеживайте их частоту с течением времени. Вы являетесь экспертами в своей стране и должны обращать внимание на необычные результаты.
- Подумайте, может ли расхождение результатов быть вызвано случайной, систематической ошибкой или ошибкой пороговых значений, и выберите подходящий метод подтверждения, если таковой имеется. Невозможно изучить все типы ошибок (например, единственным надежным подтверждающим тестом для пограничной мутации, вызывающей ЛУ к рифампицину, является секвенирование), но вы можете устранить многие причины возникновения расхождений результатов (например случайные ошибки при проведении гТЛЧ) и исключить некоторые систематические ошибки (например, если предполагаемые результаты гТЛЧ вызваны мутациями, обуславливающими значительное увеличение МИК, надежным подтверждающим тестом будет фТЛЧ).



Обращайтесь к экспертам НРЛ или ЕЛИ через форум курса OpenWHO

- Курс на английском языке: <https://openwho.org/courses/multi-drug-resistant-tb>
- Курс на русском языке: <https://openwho.org/courses/multi-drug-resistant-tb-RU>



**World Health  
Organization**

REGIONAL OFFICE FOR **Europe**

Европейская лабораторная инициатива 2022 г.

Благодарю за внимание!