

Next-Generation Sequencing sebagai Solusi Baru untuk Mendiagnosis Multidrug-Resistance Tuberculosis

Winda, Mirza Junando, Ervina Damayanti

Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Abstrak

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang biasanya disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Berdasarkan WHO, pada tahun 2022, kasus baru TB dan kematian terkait TB diperkirakan masing-masing sebanyak 6,4 juta dan 1,6 juta kasus dengan negara Indonesia menempati posisi kedua dengan beban TB terbesar di dunia. Jumlah kasus tersebut mengalami peningkatan sekitar 4.5% jika dibandingkan dengan tahun sebelumnya. Dengan diagnosis yang tepat waktu dan pengobatan dengan antibiotik lini pertama selama enam bulan, sebagian besar orang yang mengembangkan TB dapat disembuhkan dan penularan infeksi selanjutnya dapat dicegah. Metode diagnosis konvensional membutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil, sehingga menyebabkan keterlambatan diagnosis dan menyebabkan keterlambatan terapi. Teknologi *next-generation sequencing* (NGS) khususnya *whole genome sequencing* (WGS) untuk TB menawarkan pendekatan paling komprehensif dan cepat untuk DST berbasis molekuler sehingga diharapkan terapi terhadap TB dapat diberikan lebih dini dan efektif.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, *multidrug resistance tuberculosis*, *next-generation sequencing*

Next-Generation Sequencing as a Novel Solution for Diagnosing Multidrug-Resistance Tuberculosis

Abstract

Tuberculosis (TB) is an infectious disease usually caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Based on WHO, in 2022, new TB cases and TB-related deaths are expected to be 6.4 million and 1.6 million cases respectively with Indonesia in second place with the largest burden of TB in the world. The number of cases has increased by around 4.5% compared to the previous year. With timely diagnosis and treatment with first-line antibiotics for six months, most people who develop TB can be cured and further transmission of infection can be prevented. Conventional diagnostic methods take a long time to obtain results, causing delays in diagnosis and delay in therapy. Next-generation sequencing (NGS) technology, especially whole genome sequencing (WGS) for TB, offers the most comprehensive and fast approach for molecular-based DST so that TB therapy can be given earlier and more effectively.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *multidrug resistance tuberculosis*, *next-generation sequencing*

Korespondensi: Winda, alamat JL. Pulau Belitung, No.117, Kec. Sukabumi, Kota Bandar Lampung, Hp 08973695432, e-mail itsme.winda01@gmail.com

Pendahuluan

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang biasanya disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). MTB merupakan bakteri basil tahan asam aerobik dan patogen intraseluler non-motil. MTB juga disebut basil Koch karena pertama kali diisolasi pada tahun 1882 oleh seorang ilmuwan asal Jerman bernama Robert Koch yang menerima Hadiah Nobel untuk penemuan ini. Bakteri ini merupakan salah satu dari sepuluh penyebab kematian di seluruh dunia dan penyebab utama kematian dari agen infeksius tunggal dan berperingkat di atas HIV/AIDS.¹

Berdasarkan WHO, pada tahun 2022, kasus baru TB dan kematian terkait TB diperkirakan masing-masing sebanyak 6,4 juta

dan 1,6 juta kasus dengan negara Indonesia menempati posisi kedua dengan beban TB terbesar di dunia. Jumlah kasus tersebut mengalami peningkatan sekitar 4.5% jika dibandingkan dengan tahun sebelumnya.² Dengan bertambahnya insiden TB di dunia dan tingkat kematian terkait TB baru-baru ini mengakibatkan upaya pengendalian TB menjadi terhambat. Hal tersebut dipersulit kembali dengan peningkatan *multidrug-resistant* TB (MDR-TB) yang resisten terhadap setidaknya dua obat lini pertama TB (isoniazid dan rifampicin), terutama di negara-negara Asia.^{3,4}

Penyakit ini dapat menyerang siapa saja dan dimana saja, namun mayoritas individu yang berkembang menjadi TB (sekitar 90%) adalah kelompok dewasa, dengan rasio laki-laki

dan perempuan 2:1. Penyakit ini menyebar ketika individu yang terinfeksi mengeluarkan bakteri ke udara dengan batuk, bersin atau meludah. Penyakit ini terutama menyerang paru-paru yang menyebabkan TB paru, tetapi dapat juga mengenai bagian tubuh lain (TB ekstra paru) seperti ginjal, sistem saraf pusat, sistem peredaran darah, sistem limfatik, tulang dan sendi.¹ Dengan diagnosis yang tepat waktu dan pengobatan dengan antibiotik lini pertama selama enam bulan, sebagian besar orang yang mengembangkan TB dapat disembuhkan dan penularan infeksi selanjutnya dapat dicegah.

Metode diagnosis konvensional membutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil dan menyebabkan keterlambatan diagnosis yang menyebabkan keterlambatan terapi. Selanjutnya, terapi yang tertunda dan tidak adekuat dapat menyebabkan peningkatan tingkat resistensi MTB terhadap obat anti TB yang dapat menyebabkan kematian. Oleh karena itu, alat diagnostik yang cepat dan akurat sangat dibutuhkan. Diagnosis dan pengobatan MDR-TB yang berhasil tergantung pada *drug susceptibility testing* (DST).⁵ Secara konvensional, diagnosis resistensi obat terhadap MTB sangat bergantung pada kultur dan DST dalam media cair atau padat. Hasil fenotipik tersebut dapat diperoleh setelah inkubasi berminggu-minggu bahkan hingga berbulan-bulan. Selain itu, pengujian fenotip sering tidak akurat, terutama untuk obat-obatan seperti pirazinamid.⁶

Pengenalan DST berbasis molekuler untuk TB telah merevolusi diagnostik TB, dibuktikan dengan peningkatan signifikan dalam deteksi resistensi rifampicin dari 7% pada 2012 menjadi 61% pada 2019.⁷ Keuntungan paling besar yang berasal dari teknologi berbasis molekuler adalah tes GeneXpert MTB/RIF dan GeneXpert Ultra yang mendeteksi infeksi Mtb dan resistensi terhadap rifampicin dalam 1-2 jam, mengidentifikasi pasien dengan dugaan MDR-TB.⁸ Implementasi platform ini telah menunjukkan peningkatan yang substansial pada hasil tatalaksana TB seperti waktu untuk diagnosis dan terapi yang efektif.⁹ Kemudian, *Line probe assay* (LPA) seperti GenoTip MTBDRplus dan MTBDRsl yang memberikan hasil cepat dalam waktu 4–5 jam

mengenai resistansi spesifik mutasi pada obat lini pertama dan kedua yang terpilih membantu menyempurnakan pilihan rejimen MDR-TB.^{10,11}

Namun, kinerja tes genotipik ini untuk membantu pemilihan pengobatan MDR-TB yang tepat masih terbatas.^{12,13} Tidak satu pun dari pengujian tersebut menguji resistensi terhadap obat baru seperti bedaquiline, linezolid, delamanid, dan clofazimine.² Uji molekuler ini terbatas pada jumlah obat atau wilayah gen yang dianalisis. Oleh karena itu masih ada celah, di mana tidak ada pengujian yang mencakup resistensi terhadap semua obat lini pertama, lini kedua, baru dan yang digunakan kembali saat ini secara bersamaan.

Teknologi *next-generation sequencing* (NGS) khususnya *whole genome sequencing* (WGS) untuk TB menawarkan pendekatan paling komprehensif untuk DST berbasis molekuler.¹⁴ WGS memungkinkan interogasi terhadap semua mutasi yang berpotensi memberikan resistensi obat pada organisme yang menginfeksi sehingga memungkinkan individualisasi pengobatan.^{15,16}

Isi

Timbulnya resistensi obat pada MTB dapat dibagi dalam dua faktor utama yaitu faktor ekstrinsik dan faktor intrinsik. Faktor ekstrinsik berkaitan dengan determinan sosial TB dalam populasi serta kualitas layanan pengendalian dan pencegahan TB. Faktor intrinsik berhubungan dengan perolehan mutasi genetik pada gen terkait resistensi obat.^{17,18,19} Mutasi pada gen yang mengkode target obat atau enzim pengaktif obat adalah modal utama resistensi obat dan mereka muncul terutama melalui *single nucleotide polymorphism* (SNP) dan penyisipan-penghapusan (indels). Tidak seperti patogen bakteri lainnya, perolehan resistensi obat melalui transfer gen horizontal tidak ditemukan secara konsisten pada MTB.²⁰ Selain itu, resistensi obat pada MTB diyakini disebabkan oleh mutasi single-step chromosomal.¹⁹

Namun, sekarang ada bukti yang menunjukkan bahwa, setidaknya untuk obat anti-TB tertentu, resistensi obat yang didapat adalah hasil dari mutasi bertahap dan fiksasi mutasi yang mengarah ke peningkatan resistensi secara bertahap, dimulai dengan

perolehan resistensi isoniazid, kemudian diikuti oleh resistensi rifampisin atau etambutol.²¹ Resistensi terhadap isoniazid melalui mutasi KatGS315T adalah pola umum yang mendahului resistensi rifampisin.²² MDR-TB dapat terjadi sebagai resistensi obat primer yaitu ketika seseorang secara langsung terinfeksi oleh strain MTB yang resistan terhadap obat atau sebagai resistensi obat sekunder atau yang didapat yaitu terjadi karena perolehan resistansi yang disebabkan oleh mutasi selama pengobatan yang gagal terhadap orang yang rentan terhadap obat TB.²⁰ Oleh karena itu, dalam penatalaksanaan TB sebaiknya dilakukannya dengan pemeriksaan penunjang yang sekaligus dapat memeriksa resistansi obat pada MTB tersebut, tidak hanya mendeteksi keberadaan MTB saja.

Meskipun tes diagnostik molekuler cepat tersedia, tes ini tidak dapat digunakan untuk menjelaskan variasi dan mekanisme resistensi terhadap obat anti-TB. Sebagian besar tes diagnostik hanya memeriksa satu atau kombinasi gen tertentu, yang memiliki area mutasi yang paling umum, sehingga sampel memerlukan beberapa tes untuk mendapatkan pola resistensi obat yang lengkap yang diperlukan untuk memilih kombinasi obat yang tepat untuk pasien. Idealnya, alat diagnostik harus memberikan informasi lengkap tentang seluruh genom MTB.^{23,24,25} Perkembangan pesat dalam biologi molekuler dapat memberikan informasi tentang seluruh urutan gen MTB.^{23,24}

Informasi seluruh genom MTB dapat menambah pengetahuan tentang mekanisme resistensi obat anti TB karena dapat menunjukkan hubungan mutasi gen spesifik dengan resistensi obat. Alhasil, mekanisme molekuler dari resistensi obat tertentu diketahui dan dapat digunakan untuk meningkatkan teknik yang tersedia saat ini untuk deteksi cepat MDR-TB.^{26,27}

Saat ini, NGS banyak digunakan untuk diagnosis cepat resistensi obat, sehingga pengobatan prospektif dan prognosis pasien MDR-TB dapat lebih baik. Selain itu, NGS dapat digunakan untuk mengurutkan seluruh genom MTB. Namun, ada beberapa tantangan dalam menggunakan NGS yaitu preparasi sampel yang rumit, sehingga metodologinya perlu disederhanakan dan dioptimalkan untuk sampel

dahak langsung; di beberapa negara berkembang, kekurangan sumber daya manusia dan biaya yang tinggi dapat menghambat penggunaannya dalam surveilans global.⁴

NGS menyediakan opsi untuk mendeteksi seluruh karakteristik MDR-TB. Tidak seperti tes molekuler lain, NGS dapat memberikan informasi genom lengkap yang terperinci. Dalam NGS, setiap bagian genom diurutkan beberapa kali, sehingga penilaian ini memberikan data yang akurat tentang keberadaan polimorfisme genetik.²³ Oleh karena itu, NGS dapat mengonfirmasi dan menilai mutasi tingkat genom yang tidak dapat dideteksi oleh tes molekuler lainnya. Selain itu, NGS fleksibel dan dapat diprogram untuk berbagai aplikasi, seperti penilaian informasi genetik mikroorganisme selain MTB yang ada dalam sampel klinis.²⁸

Terlepas dari tantangannya, manfaat penggunaan NGS tetap lebih banyak dibandingkan dengan metode lain, ketika digunakan untuk diagnosis, untuk menentukan pengobatan yang tepat, dan epidemiologi. Manfaat NGS diantaranya adalah waktu diagnosis MTB yang lebih cepat (dari minggu dalam metode lain hingga berjam-jam dalam NGS), jumlah informasi yang diberikan (informasi tentang strain, apakah infeksi tunggal atau ganda, membedakan kekambuhan dari infeksi ulang, profil resistensi obat, dan rantai penularan) dan kenyamanan (potensi untuk menggabungkan diagnosis, resistensi obat, dan analisis epidemiologi) yang dapat dikumpulkan secara *real-time*. Selain itu, NGS dapat dilakukan pada spesimen klinis langsung atau isolat MTB yang dikultur.²⁹

WGS kini telah menjadi standar perawatan di lingkungan dengan sumber daya yang baik.^{30,31} Kapasitas WGS untuk melacak infeksi campuran, heteroresistensi, pola penularan, wabah, dan potensi penyebaran super memberikan keuntungan klinis yang lebih baik.^{32,33} Data yang baru-baru ini diterbitkan menggambarkan ketepatan antara Xpert, LPA dan WGS dibandingkan dengan DST fenotipik untuk memprediksi resistensi terhadap 15 obat, masing-masing dilaporkan sebagai 49, 63, dan 93%.³⁴

Ringkasan

TB merupakan salah satu dari sepuluh penyebab kematian di seluruh dunia dan penyebab utama kematian dari agen infeksius tunggal. Diagnosis sedini mungkin serta pemberian terapi yang sesuai dan adekuat merupakan hal yang utama dalam penatalaksanaan penyakit ini. Namun, metode diagnosis konvensional membutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil dan menyebabkan keterlambatan diagnosis yang menyebabkan keterlambatan terapi. Teknologi NGS khususnya WGS untuk TB menawarkan pendekatan paling komprehensif untuk DST berbasis molekuler.

Simpulan

Next-generation sequencing berguna untuk mendiagnosis *multidrug-resistance tuberculosis* dengan ketepatan 93% dan lebih cepat dibandingkan metode konvensional.

Daftar Pustaka

1. Bhowmik D, Chandira RM, Jayakar B, Sampath Kumar KP. Recent trends of drug used treatment of tuberculosis. *J Chem Pharm.* 2009; (1): 113–133.
2. World Health Organization. WHO Consolidated Guidelines on Drug-resistant Tuberculosis Treatment. Geneva; 2019.
3. WHO. Global tuberculosis report 2022; 2022.
4. Walker T, Radcliffe J, Way H. Headington. DNA sequencing predicts 1st-line tuberculosis drug susceptibility. *The New England Journal of Medicine.* 2018; 379(15): 1403-1415.
5. Dahanayake MH dan Jayasundera ACA. Nano-based drug delivery optimization for tuberculosis treatment: A review. *J Microbiol Methods.* 2021; 181:106-127.
6. Gilpin C, Korobitsyn A, Weyer K. Current tools available for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutic Advances in Infectious Diseases.* 2016; 3(6):145-151
7. WHO. Catalogue of Mutations in Mycobacterium tuberculosis Complex and Their Association with Drug Resistance; 2021.
8. WHO. Automated Real-time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children; 2013.
9. Schumacher SG, Sohn H, Qin ZZ, Gore G, Davis JL, Denkinger CM, et al. Impact of molecular diagnostics for tuberculosis on patient-important outcomes: a systematic review of study methodologies. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151073.
10. Hain Lifescience GmbH. GenoType MTBDRplus VER 2.0; 2021.
11. Hain Lifescience GmbH. GenoType MTBDRsl VER 1.0 and VER 2.0; 2021.
12. Mishra H, Reeve B, Palmer Z, Caldwell J, Dolby T, Naidoo C, et al. Diagnostic accuracy and predictive value of Xpert Ultra and Xpert MTB/RIF for tuberculosis diagnosis in an HIV-endemic setting with a high burden of previous tuberculosis. *Lancet Respir Med.* 2020; (8): 368–382.
13. Guglielmetti L, Sougakoff W, Maitre T, Brossier F, Jarlier V, Robert J, et al. Poor performance of rapid molecular tests to define eligibility for the shortcourse multidrug-resistant tuberculosis regimen. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 68: 1410–1411.
14. Iketleng T, Lessels R, Dlamini MT, Mogashoa T, Mupfumi L, Moyo S, et al. Mycobacterium tuberculosis next-generation whole genome sequencing: opportunities and challenges. *Tuberc Res Treat.* 2018; 1-8.
15. Witney AA, Gould KA, Arnold A, Coleman, D, Delgado R, Dhillon J, et al. Clinical application of whole-genome sequencing to inform treatment for multidrug-resistant tuberculosis cases. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1473–1483.
16. Cox H, Hughes J, Black J, Nicol MP. Precision medicine for drug-resistant tuberculosis in high-burden countries: is individualised treatment desirable and feasible. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18: 282 - 287.
17. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiol.* 2017; 41: 354 - 373.

18. Nguyen QH, Contamin L, Nguyen TVA, Banuls AL. Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Evol Appl*. 2018; 11: 1498 - 1511.
19. Swain SS, Sharma D, Hussain T, Pati S. Molecular mechanisms of underlying genetic factors and associated mutations for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect*. 2020; 9: 1651 - 1663.
20. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, dan Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73: 1138 - 1151.
21. Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, et al. 2015. Evolution of extensively drug-resistant tuberculosis over four decades: whole genome sequencing and dating analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from KwaZulu-Natal. *PLoS Med*. 2015; 12: e1001880.
22. Manson AL, Cohen KA, Abeel T, Desjardins CA, Armstrong DT, Barry CE, et al. 2017. Genomic analysis of globally diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance. *Nat Genet*. 2017; 49: 395 - 402.
23. Dlamini MT, Lessells R, Iketleng T, de Oliveira T. Whole genome sequencing for drug-resistant tuberculosis management in South Africa: What gaps would this address and what are the challenges to implementation. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. 2019; 16: 100115.
24. Hunter RL. The pathogenesis of tuberculosis: The early infiltrate of post-primary (adult pulmonary) tuberculosis: A distinct disease entity. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: 2108.
25. Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics (Basel)*. 2014; 3(3): 317- 340.
26. Falzon D, Gandhi N, Migliori GB, Sotgiu G, Cox HS, Holtz TH, et al. Resistance to fluoroquinolones and second-line injectable drugs: Impact on multidrug-resistant TB outcomes. *European Respiratory Journal*. 2013; 42(1): 156-168.
27. Jeanes C, O'Grady J. Diagnosing tuberculosis in the 21st century – Dawn of a genomics revolution? *International Journal of Mycobacteriology*. 2016; 5(4): 384 - 391.
28. WHO. 2018. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. WHO.
29. Cohen KA, Manson AL, Desjardins CA, Abeel T, Earl AE. Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using wholegenome sequencing: progress, promise, and challenges. *Genome Medicine*. 2019; 11: 45.
30. Tagliani E, Cirillo DM, Ködmön C, van der Werf MJ. EUSeqMyTB to set standards and build capacity for whole genome sequencing for tuberculosis in the EU. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18:377.
31. Allix-Béguec, C, Arandjelovic I, Bi L, Beckert P, Bonnet M, Bradley P, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *J Med*. 2018; 379: 1403–1415.
32. McNerney R, Zignol M, Clark TG. Use of whole genome sequencing in surveillance of drug resistant tuberculosis. *Expert Rev. Anti Infect*. 2018; 16: 433 - 442.
33. Lee RS, Proulx JF, McIntosh F, Behr MA, Hanage WP. Previously undetected super-spreading of mycobacterium tuberculosis revealed by deep sequencing. 2018; 9: e53245.
34. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, Olaru ID, Schön T, Sturegård E, et al. What is resistance? impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on therapy for multi- and extensively drug-resistant Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2018; 62: 1 - 12.