

**Școala doctorală în domeniul Științe medicale**

**Cu titlu de manuscris**

**C.Z.U.: 616-002.5:579.873.21:579.252.55(043.2)**

**CHESOV ELENA**

**DIVERSITATEA GENOTIPICĂ ȘI REZISTENȚA LA  
MEDICAMENTE A TULPINILOR DE *MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS***

**313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ**

**Rezumatul tezei de doctor în științe medicale**

**Chișinău, 2024**

Teza a fost elaborată în cadrul Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă, Instituția Publică Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

**Conducător științific**

Valeriu Crudu,  
conf. cercet., dr.șt.med.,

**Conducător prin cotutelă**

Christoph Lange,  
prof. univ., dr. hab. șt. med.

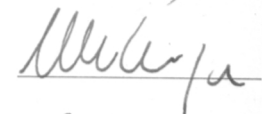
**Membrii comisiei de îndrumare:**

Valeriu Rudic,  
academician, prof. univ, dr.hab.șt.med.

Serghei Pisarenco,  
prof. cercetător, dr.hab.șt.med.

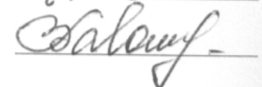
Greta Bălan,  
conf. univ., dr.hab. șt.med.











Susținerea tezei va avea loc la data de 23 octombrie, ora 14:00, în incinta USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205, în ședința aprobată prin Decizia Senatului nr. 48 din 26.06.2024 din cadrul Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

**Componenta Comisiei de susținere publică:**

**Președinte:**

Alexandru Corlăteanu,  
dr. hab. șt. med., prof. univ.

**Membrii**

Vorojbit Valentina,  
dr. șt. med., conf. univ.

Crudu Valeriu,  
dr. șt. med., conf. cercet.

Lange Christoph,  
profesor universitar, dr. hab. șt. med.

**Referenți oficiali:**

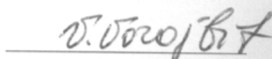
Greta Bălan,  
dr. hab. șt. med, conf. univ.

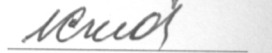
Rusu Doina,  
dr. șt. med., conf. univ.

Burduniuc Olga,  
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Autor  
Chesov Elena

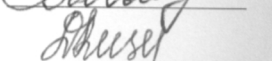


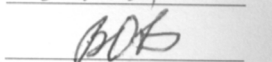


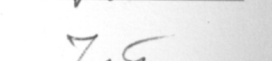


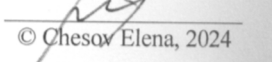












## Cuprins

Repere conceptuale ale tezei .....	4
Conținutul tezei .....	9
1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - determinante genetice asocieri epidemiologice și clinice .....	9
2. Diversitatea genotipică a <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> în republica moldova în contextul dezvoltării rezistenței antimicrobiene și caracteristicilor clinice ale bolii.....	10
2.1 Reconstrucția filogenetică și transmiterea tulpinilor <i>M. tuberculosis complex</i> rezistente la medicamente în Republica Moldova 2013-2018 .....	10
2.2 Determinante genetice ale <i>M. tuberculosis</i> cu rol potențial în răspândirea tulpinilor multidrog-rezistente în Republica Moldova.....	13
2.3 Asocieri dintre determinatele genotipice cu impact asupra rezistenței la antimicrobiene a <i>M. tuberculosis</i> și evoluției clinice a TB .....	17
3. Dezvoltarea rezistenței la bedaquilină a tulpinilor de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> în Republica Moldova .....	19
4. Rezistența la linezolid a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - factori de risc și determinante genetice .....	24
Concluzii generale și recomandări.....	28
Bibliografie selectivă.....	29
Lista publicațiilor și manifestărilor științifice .....	31
Adnotare.....	34
Аннотация.....	34
Summary .....	36

## REPERE CONCEPTUALE ALE TEZEI

### Actualitatea temei

Tuberculoza (TB) este una dintre cele mai mari provocări de sănătate publică la nivel global. În anul 2022 Organizația Mondială a Sănătății a estimat 10,6 milioane de îmbolnăviri noi și 1,3 milioane de decese cauzate de tuberculoză [1]. În prezent, unul dintre cele mai importante obstacole în reducerea impactului tuberculozei asupra sănătății publice sunt cazurile de boală cauzate de tulpinile de *Mycobacterium tuberculosis* cu rezistență concomitentă la izoniazidă și rifampicină (tulpini MDR) [2]. Incidența cazurilor de TB MDR este deosebit de alarmantă în țările din Europa de Est, unde rata MDR în rândul pacienților cu TB nou-diagnosticați depășește 30%, iar în cazurile de retratament - depășește 50% [3]. Întreruperea aprovizionării cu medicamente și implementarea defectuoasă a regimurilor de tratament în deceniile precedente precum și controlul infecțios deficitar de rând cu întârzierea diagnostică au determinat selectarea și mențin transmiterea activă a tulpinilor rezistente și extinderea endemiei de TB MDR în această regiune [4–6]. În același timp, adaptabilitatea și diversitatea genetică a tulpinilor de *M. tuberculosis complex*, ar putea influența în mod direct perpetuarea fenomenului de rezistență și răspândirea bolii. Astfel, caracteristicile genomice ale *M. tuberculosis complex* ar putea contribui la selecția și transmiterea tulpinilor rezistente la medicamente. În special, astfel de caracteristici genomice precum mutațiile compensatorii și mutațiile homoplazice, ar putea conferi avantaje tulpinilor de *M. tuberculosis complex* cu rezistență la medicamentele antituberculoase [7].

Studiile cu utilizarea datelor de secvențiere a genomului tulpinilor de *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova, efectuate anterior prezentei lucrări, au urmărit investigarea liniilor genotipice circulante ale acestei bacterii și istoricul presupus al transmiterii în această zonă geografică [8, 9]. La fel, datele de secvențiere au fost aplicate pentru evaluarea fenomenului de transmite nosocomială a tulpinilor de *M. tuberculosis complex* în instituțiile medicale specializate în tratamentul bolnavilor de tuberculoză [10]. În același timp, aspecte precum determinantele genetice ale răspândirii cu succes anume a tulpinilor de *M. tuberculosis* MDR în această arie

geografică precum și cele ce se referă la potențialele asocieri dintre trăsăturile genetice ale tulpinilor micobacteriene și caracteristicile clinice ale bolii tuberculoase au rămas în mare parte nestudiate.

În această lucrare a fost evaluată structura genetică a tulpinilor de *M. tuberculosis complex* cu patern MDR izolate pe teritoriul Republicii Moldova selectate pe o perioadă de șase ani consecutivi, în baza datelor de secvențiere a întregului genom micobacterian. Analiza datelor de secvențiere a permis să caracterizăm diversitatea genetică, evoluția și relațiile filogenetice dintre tulpinile MDR de *M. tuberculosis complex*. În special, a fost determinat rolul putativ al unor caracteristici genomice precum mutațiile homoplazice și cele compensatorii, asupra evoluției TB MDR și asocierea genotipurilor *M. tuberculosis complex* cu caracteristicile clinice ale bolii tuberculoase. O atenție specială a fost acordată asocierii dintre caracteristicile genetice micobacteriene și potențialele deficiențe ale managementului clinic al bolii cu dezvoltarea rezistenței față de medicamentele antituberculoase noi sau cele repropuse cum sunt bedaquilina și linezolidul.

**Cuvinte cheie:** TB, *M. tuberculosis complex*, MDR, diagnostic de laborator, secvențierea întregului genom, factori de risc, linii genotipice.

**Domeniul de studiu:** Microbiologie

**Scopul lucrării**

De a studia diversitatea genotipică și caracteristicile molecular-genetice ale tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis* din Republica Moldova cu impact asupra fenomenului de rezistență.

**Obiectivele cercetării**

1. Aprecierea diversității genotipice și a evoluției temporale a tulpinilor multidrog-rezistente de *Mycobacterium tuberculosis* în Republica Moldova.
2. Identificarea determinantelor genetice ale *Mycobacterium tuberculosis* cu rol putativ în răspândirea tulpinilor multidrog-rezistente în Republica Moldova.

3. Stabilirea potențialelor asocieri dintre determinantele genotipice cu impact asupra rezistenței la antimicrobiene a *Mycobacterium tuberculosis* și evoluției clinice a tuberculozei.
4. Identificarea corespondențelor genotipice ale rezistenței micobacteriene la medicamentele cheie utilizate în tratamentul tuberculozei multidrog-rezistente.

### **Metodologia generală a cercetării**

Pentru atingerea obiectivelor lucrării au fost realizate trei studii care au implicat atât loturi de cercetare cât și soluții diferite de analiză statistică.

Din perspectivă metodologică primul studiu are o componentă descriptivă a datelor de epidemiologie moleculară rezultate din secvențierea genomurilor *M. tuberculosis complex* pe parcursul perioadei 2013-2018, în cadrul căreia au fost aplicate statistici comparative pentru a evidenția diferențele dintre liniile genotipice ale *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova. În special, au fost comparate determinantele genetice asociate cu rezistența la medicamentele antituberculoase, frecvența și tipul mutațiilor compensatorii precum și a celor homoplazice. La fel, acest studiu a inclus o componentă analitică în cadrul căreia a fost aplicat un model de regresie logistică multiplă pentru a evidenția asocierea dintre determinantele genotipice ale diferitor linii de *M. tuberculosis complex* și caracteristicile clinice ale tuberculozei, precum severitatea leziunilor imagistice și rezultatul negativ al tratamentului antituberculos.

Cel de al doilea studiu a inclus o componentă descriptivă de documentare a apariției rezistenței la bedaquilină, la scurt timp de la includerea acestui medicament în schemele de tratament, la bolnavii cu TB MDR în Republica Moldova și a corelațiilor geno-fenotipice a rezistenței față de acest medicament. Complementar, studiul a inclus o componentă analitică în cadrul căreia a fost generat un model de regresie logistică multiplă care a evaluat factorii asociați cu rezultatul negativ al terapiei antituberculoase, inclusiv potențiala asociere cu linia genotipică a *M. tuberculosis*, la bolnavii cu TB MDR care administrează scheme de tratament ce conțin bedaquilină.

Cel de al treilea studiu a reprezentat un studiu de cohortă în care au fost evidențiate factorii de risc pentru achiziționarea de către *M. tuberculosis complex*, pe parcursul tratamentului antituberculos, a rezistenței față de linezolid, concomitent, fiind descrise frecvența fenomenului de rezistență la linezolid și mutațiile genice asociate cu rezistența la acest medicament, la tulpinile MDR de *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova.

### **Noutatea și originalitatea**

Rezultatele prezentului studiu descriu diversitatea genotipică a *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova în baza analizei datelor de secvențiere a întregului genom micobacterian (Whole Genome Sequencing) obținute în baza unui lot de izolate micobacteriene selectate dintr-o perioadă de timp semnificativ mai lungă (6 ani) decât în studiile anterioare, ceea ce a permis descrierea evoluției temporale a genotipurilor micobacteriene și a determinantelor genetice ale rezistenței la medicamentele antituberculoase. Utilizând același set de date de secvențiere a fost analizat, pentru prima dată pe un lot de izolate provenit din Europa de Est, rolul putativ al mutațiilor compensatorii și a unor mutații homoplazice în evoluția endemiei de TB MDR în această regiune, anterior asocierile dintre aceste tipuri de mutații și caracteristicile tulpinilor de TB MDR au fost descrise doar pe izolate provenite din Asia Centrală și Africa de Sud. La fel, elementul novatoriu al lucrării este asigurat de evidențierea asocierilor dintre deficiențele de management clinic și apariția rezistenței la preparatele antituberculoase la bolnavii TB tratați în cadrul Programului național de răspuns la tuberculoză din Republica Moldova.

### **Rezultatele obținute care au determinat soluționarea unei probleme științifice, aplicative de importanță majoră**

- Majoritatea covârșitoare a tulpinile MDR de *M. tuberculosis complex* circulante în Republica Moldova aparțin într-o proporție relativ stabilă (pe durata observată în studiu) liniilor genotipice L2 (2.2.1 Central Asia 56%, 2.2.1 Europe/Rusian W148 outbreak 22%, 2.2.1 Central Asia outbreak 17%) și L4 (4.2.1 Ural 91%), care manifestă diferențe semnificative în rezistența la medicamentele antituberculoase.
- Tulpinile MDR de *M. tuberculosis complex* ce aparțin liniei genotipice

L2, circulante în Republica Moldova, se caracterizează prin forme cu leziuni imagistice mai severe de tuberculoză pulmonară, fapt asociat cu prezența în genomul micobacterian a mutației Rv2828c T141R, fiind observată o selecție pozitivă pentru această mutație.

- Tulpinile MDR de *M. tuberculosis complex* ce aparțin liniilor genotipice L4, circulante în Republica Moldova, se caracterizează printr-o rată deosebit de mare de transmitere în populație, unul dintre factorii potențiali asociați cu succesul epidemiologic al acestor tulpini fiind prezența mutațiilor compensatorii pentru rifampicină în gena *rpoC* a micobacteriei.
- În condițiile managementului programatic al bolnavilor de tuberculoză în Republica Moldova rezistența tulpinilor de *M. tuberculosis complex* la medicamentele noi și repropuse precum bedaquilina și linezolidul este achiziționată secundar tratamentului TB MDR prin aplicarea unor scheme de tratament deficitare.

### **Semnificația teoretică**

Rezultatele acestei lucrări oferă argumentarea teoretică pentru succesul răspândirii liniilor filogenetice de *M. tuberculosis complex* L2 și L4 în Republica Moldova, în special identificând unele determinante genetice asociate cu selecția pozitivă a genotipurilor L2 precum și cele care avantajează răspândirea genotipurilor L4. În cazul tulpinilor L2 caracteristicile genetice identificate ar condiționa forme mai grave de tuberculoză pulmonară (forme cavitare, cu risc sporit de eșec al terapiei) cu o potențială infecțiozitate mai prelungită a acestor bolnavi, iar în cazul tulpinilor L4 achiziționarea mutațiilor compensatorii (*rpoC*) ar îmbunătăți adaptabilitatea biologică a acestor tulpini, fiecare dintre modificările genetice menționate ar avantaja transmiterea în populație a genotipurilor respective. La fel, teza aduce ilustrarea teoretică a achiziționării rezistenței la medicamentele antituberculoase noi, secundar includerii acestora în scheme terapeutice deficitare utilizate la bolnavii de TB MDR.



## **Valoarea aplicativă**

Datele privitor la particularitățile corelației rezistenței genotipice și diferențele acestora dintre cele două genotipuri identificate (L2 și L4) în prezentul studiu își pot găsi aplicația în perfecționarea metodelor de testare a sensibilității la medicamente a tulpinilor *M. tuberculosis complex*. La fel, determinantele genetice găsite în prezentul studiu, ca fiind asociate răspândirii deosebit de eficiente a genotipurilor L2 și L4 a tulpinilor MDR ale *M. tuberculosis complex* în Republica Moldova, pot fi aplicate în studierea molecular-epidemiologică a focarelor de tuberculoză în cadrul anchetelor epidemiologice. Adicional, datele privind achiziționarea rezistenței la bedaquilină și linezolid pot fi utilizate de către medicii specializați în tratamentul TB MDR precum și de către specialiștii în sănătate publică pentru a ghida deciziile terapeutice și a reduce riscul de dezvoltare a rezistenței secundare la medicamentele esențiale utilizate în prezent, în tratamentul TB MDR, precum și la medicamentele noi care urmează a fi implementate în cadrul Programului național de răspuns la tuberculoză.

## **Implementarea rezultatelor**

Rezultatele tezei au fost implementate în cadrul Laboratorului național de referință în microbiologia tuberculozei din cadrul Institutului de fiziopneumologie "Chiril Draganiuc", fiind obținute două acte de implementare în procesul științifico-practic și două certificate de inovator.

Rezultatele tezei au fost reflectate în 15 publicații științifice inclusiv 3 articole în reviste indexate în baza de date Web of Science, 2 - articole în reviste din registrul național al revistelor de profil, 10 - teze. La fel, rezultatele cercetării au fost prezentate la 12 foruri și evenimente științifice.

## **CONȚINUTUL TEZEI**

### **1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS - DETERMINANTE GENETICE ASOCIERI EPIDEMIOLOGICE ȘI CLINICE**

Capitolul prezintă și sintetizează date relevante din literatura de specialitate, privitor la liniile genotipice ale *M. tuberculosis complex*. Sunt descrise detaliat tehnicile de analiză moleculară și testare a sensibilității fenotipice și genotipice. Au fost descrise mutațiile cunoscute din genomul micobacterian asociate cu rezistența la medicamentele antituberculoase,

precum și potențialele caracteristici genotipice care ar putea favoriza selecția evolutivă a tulpinilor de *M. tuberculosis complex*.

## **2. DIVERSITATEA GENOTIPICĂ A *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* ÎN REPUBLICA MOLDOVA ÎN CONTEXTUL DEZVOLTĂȚII REZISTENȚEI ANTIMICROBIENE ȘI CARACTERSITICILOR CLINICE ALE BOLII**

Capitolul descrie metodologia și rezultatele cercetării dedicate reconstrucției filogenetice a tulpinilor MDR de *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova și evoluția temporală a acestora, cu identificarea asocierilor dintre liniile genotipice ale *M. tuberculosis complex* (MTBC) și leziunile cavitare precum și rezultatul negativ al tratamentului antituberculos la bolnavii TB MDR. În acest scop a fost realizat un studiu de cohortă retrospectiv pe izolate de MTBC prelevate din biobanca Laboratorului național de referință în microbiologia tuberculozei (LNR) din Chișinău, Republica Moldova. Au fost selectate aleatoriu 60 de izolate pentru 6 ani consecutivi (2013-2018). Probele rezultate în urma selectării (n=360) au fost reînsămânțate pe medii Löwenstein-Jensen și supuse extragerii ADN și secvențierii întregului genom. Tulpinile MTBC care conțineau genotipuri mixte și/sau discrepanțe majore între profilurile fenotipice și genotipice de rezistență la medicamente au fost excluse din analiza finală. Pentru izolatele rămase (n=288), datele epidemiologice și clinice disponibile (vârsta, sexul, istoricul de TB, comorbidități relevante, numărul de medicamente din regimul terapeutic, leziunile cavitare la radiografia toracică, rezultatul tratamentului fiecărui pacient) au fost extrase din Sistemul Electronic Național de Monitorizare și Evaluare a Tuberculozei (SIME-TB).

### **2.1 Reconstrucția filogenetică și transmiterea tulpinilor *M. tuberculosis complex* rezistente la medicamente în Republica Moldova, 2013-2018**

Dintre cele 288 de tulpini de *M. tuberculosis complex* analizate, 124 (43%) au fost clasificate ca aparținând liniei 2 (L2), iar 164 (57%) tulpini - liniei 4 (L4). Tulpinile L2 au cuprins următoarele sublinii: Asia Centrală (56%), focarul W148 din Europa/Rusia (22%), focarul din Asia Centrală

(17%) și câte o tulpină ca fiind Ancestral 1 și, respectiv, Ancestral 2. Marea majoritate (91%) a izolatelor L4 au aparținut unei singure sublinii, și anume 4.2.1 (Ural). Tulpinile din linia 2, cât și cele din linia 4 au avut o rată similară, care nu s-a schimbat în timp ( $p > 0,09$ ). Rata de clusterizare în tulpinile secvențiate a fost de (51,7%). Aceasta a fost mai mare la tulpinile din linia 4 (L4) decât la cele din linia 2 (L2) (63% pentru L4 față de 36,3% pentru L2,  $p < 0,001$ ).

Tulpinile de *M. tuberculosis complex* din linia 4 au făcut parte din 11 clustere moleculare (reconstrucție filogenetică cu o distanță genetică de 5 SNP). Cel mai mare cluster L4 a cuprins 75 de tulpini 4.2.1/Ural, pe lângă acesta au fost identificate și 10 clustere mai mici ce cuprindeau de la 2 la 8 tulpini.

Dintre tulpinile genotipului L2, 45 de tulpini (36,3%) au făcut parte din 16 clustere, inclusiv 3 clustere fiecare dintre care a inclus 6 tulpini. Rata tulpinilor L4 grupate în clustere a fost mai mare decât a celor ce aparțineau L2 ( $p < 0,001$ ), (63% pentru L4 față de 36,3% pentru L2,  $p < 0,001$ ).

Pentru cuantificarea transmiterii recente a tulpinilor micobacteriene, a fost evaluată lungimea brațelor terminale în arborele filogenetic pentru tulpinile L2 și L4. Tulpinile L4 au avut o lungime mediană a brațelor terminale mai scurtă în comparație cu tulpinile L2 ( $5,479 \times 10^{-4}$  [ÎC (intervalul dintre quartile)  $3,656 \times 10^{-4} - 2,019 \times 10^{-3}$ ] față de  $8,233 \times 10^{-4}$  [ÎC  $1,826 \times 10^{-4} - 1,097 \times 10^{-3}$ ],  $p = 0,0002$ ), sugerând o transmisibilitate mai mare a tulpinilor L4 (Figura 2).

S-a observat că mai multe tulpini L2 decât L4 au fost rezistente la fluorochinolone, PAS, pirazinamidă, etambutol, amikacină și capreomicină (Figura 2 D). Viceversa, rezistența la etionamidă și kanamicină a fost mai frecventă în rândul tulpinilor L4. Nu s-au constatat diferențe între L2 și L4 în ceea ce privește rezistența la cicloserină și streptomycină. De asemenea, au fost observate diferențe statistic semnificative în ceea ce privește frecvența mutațiilor specifice la tulpinile L2 și L4 care conferă rezistență la izoniazidă, rifampicină, etambutol, etionamidă, PAS și kanamicină

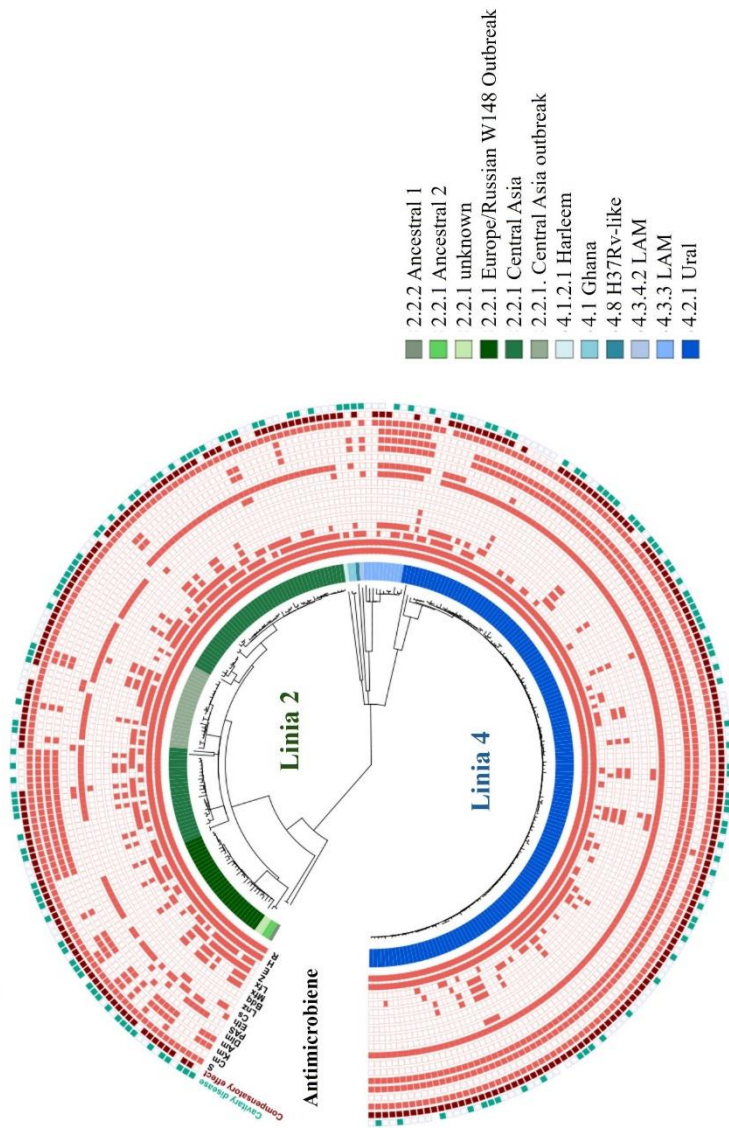


Figura 1. Arborele filogenetic al tulpinilor MTBC M/XDR din Republica Moldova, 2013-2018

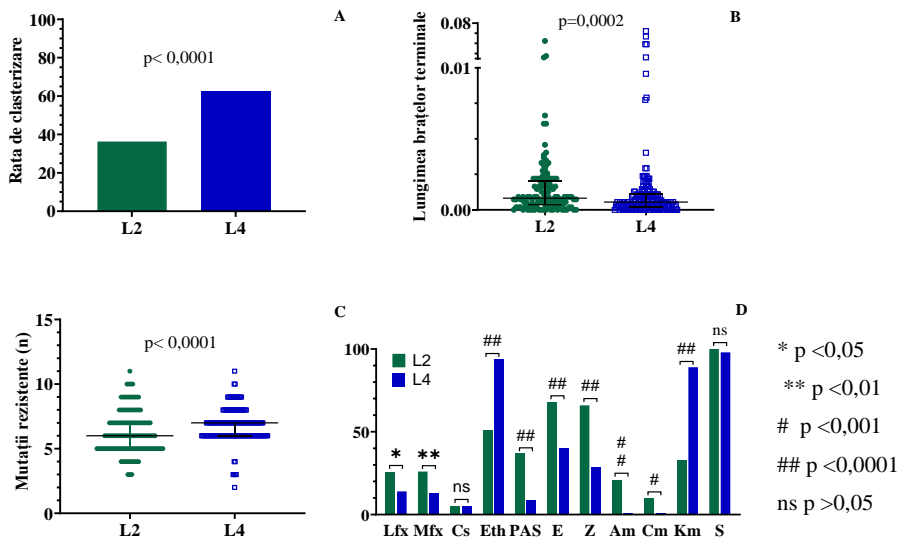


Figura 2. Transmiterea MTBC și rezistența la medicamente în Republica Moldova 2013-2018

## 2.2 Determinante genetice ale *M. tuberculosis* cu rol potențial în răspândirea tulpinilor multidrog-rezistente în Republica Moldova

Majoritatea tulpinilor secvențiate (259/288, 90%) au fost purtătoare de cel puțin o mutație putativ compensatorie. Mai exact, 212 tulpini prezentau o mutație în *rpoC*, 38 de tulpini prezentau o mutație compensatorie în *rpoB*, 8 tulpini prezentau o mutație în *rpoA*, 38 de tulpini au fost găsite cu o mutație în regiunea promotorului *thyX*, iar 3 tulpini prezentau o mutație în regiunea promotorului *ahpC*. Dintre acestea, 41 de tulpini prezentau mutații în mai mult de o genă, dintre cele menționate anterior.

Proporția de mutații putativ compensatorii în *rpoC* a fost mai mare la tulpinile L4 în comparație cu tulpinile L2 (81,1% față de 63,7%,  $p=0,001$ ), în principal din cauza expansiunii clonale a tulpinilor 4.2.1/Ural cu mutația *rpoC* V483G. Mutațiile compensatorii în *rpoB* au fost mai răspândite în rândul izolatelor L2 decât în rândul izolatelor L4, (18,5% vs 9,1%,  $p=0,02$ ). Mutațiile în *rpoA* au fost prezente doar în tulpinile L2 (6,45% vs 0%,  $p=0,001$ ). De asemenea, posibilele mutații compensatorii în *thyX* au fost mai

des întâlnite în tulpinile L2 (29,03% vs 1,2%,  $p < 0,00001$ ). Mutații în regiunea promotorului genei *ahpC* au fost identificate doar în 3 izolate (două L4 și unul L2).

În special, izolatele cu o mutație compensatorie în *rpoC* au avut o rată de clusterizare mai mare decât izolatele care nu au o astfel de mutație (57,2 % față de 33,3 %,  $p = 0,0007$ ) (Figura 3 B). În funcție de linia genetică, această observație a fost semnificativă din punct de vedere statistic numai în cazul izolatelor L4 (67,7 % vs 45,2 %,  $p = 0,02$ ) și nu și în cazul L2 (41,8 % vs 26,7 %  $p = 0,1$ ). Tulpinile care au prezentat mutații *rpoA* au avut o rată de clusterizare mai mică și o lungime mai mare a brațelor terminale (0% vs 53,2%,  $p = 0,003$ ) și ( $2,2 \cdot 10^{-3}$  vs  $6,09 \cdot 10^{-4}$ ,  $p = 0,0002$ ), în mod corespunzător (Figura 3 C, G). De remarcat numărul limitat de tulpini cu mutații *rpoA* - doar 8 tulpini, toate aparținând L2. Astfel, compararea ratei de clusterizare și a lungimii brațelor terminale între izolatele L2 cu mutații compensatorii în *rpoA* și cele care nu au mutații, arată o diferență semnificativă doar pentru lungimea brațelor terminale ( $2,2 \cdot 10^{-3}$  [ÎÎC  $2,0 \cdot 10^{-3}$  -  $2,3 \cdot 10^{-3}$ ] față de  $7,3 \cdot 10^{-4}$  [ÎÎC  $3,6 \cdot 10^{-4}$  -  $1,6 \cdot 10^{-3}$ ],  $p = 0,002$ , corespunzător) și nu pentru rata de clusterizare (Figura 3 G, K). Nu a existat nicio diferență între prezența/absența mutațiilor compensatorii în *rpoA* grupat după numărul de mutații rezistente la medicamente în întreaga cohortă și în fiecare dintre cele două linii principale (Figura 3 L). Tulpinile cu o mutație în regiunea promotorului genei *thyX* au avut mai puține mutații de rezistență la medicamente decât tulpinile fără mutații în promotorul genei *thyX* (6 [ÎÎC 5-7] vs 7 [ÎÎC 6-8],  $p = 0,005$ ), nu s-au observat diferențe în ceea ce privește rata de clusterizare sau lungimea brațelor terminale în comparație cu tulpinile fără mutații *thyX* (Figura 3 H, M).

La fel, tulpinile L2 care au mutații în promotorul genei *thyX* au avut o rată de clusterizare mai mare (61,1% vs 26,1%,  $p = 0,0004$ ) și o lungime a brațelor terminale mai mică ( $5,4 \cdot 10^{-4}$  [ $1,8 \cdot 10^{-4}$  vs  $8,6 \cdot 10^{-4}$ ] vs  $1,0 \cdot 10^{-3}$  [ $5,4 \cdot 10^{-4}$  -  $2,2 \cdot 10^{-3}$ ],  $p < 0,0001$ ) în comparație cu tulpinile L2 fără astfel de mutații, în timp ce tulpinile L4 care au avut mutații în promotorul *thyX* au avut o lungime a brațelor terminale mai

mare decât cele L4 fără astfel de mutații ( $2,0 \cdot 10^{-2}$  [ $2,0 \cdot 10^{-2}$  -  $3,8 \cdot 10^{-2}$ ] vs  $5,4 \cdot 10^{-4}$  [ $1,8 \cdot 10^{-4}$  -  $1,0 \cdot 10^{-4}$ ],  $p=0,02$ ) (Figura 3 H, M).

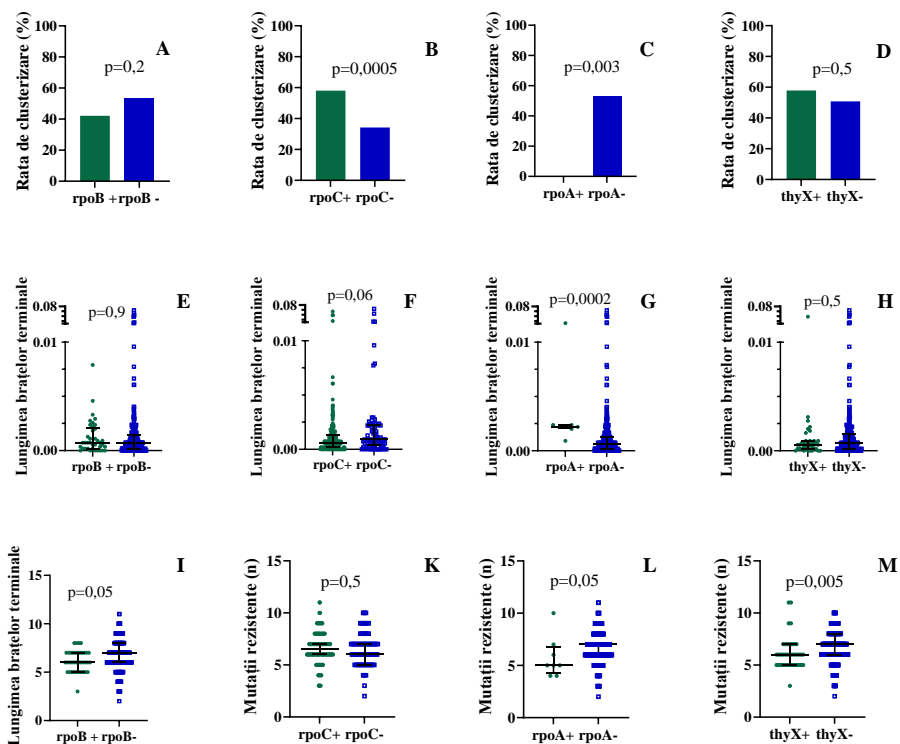


Figura 3. Mutații compensatorii și transmisibilitatea în întreaga cohortă de tulpini de *M. tuberculosis* complex

### Homoplazia și posibilă selecție pozitivă

În tulpinile secvențiate au fost detectate 145 de mutații care prezentau semne de homoplazie (mutații identice în subgrupuri care nu au legătură filogenetică), care ar putea indica o selecție pozitivă a acestor loci genomici. Dintre acestea nu au fost luate în considerare 75/145 de mutații care au fost mutații cu codoni sinonimi sau mutații localizate în regiuni repetitive, cum

ar fi familia de gene PE/PPE, pseudogene, secvențe de inserții și fagi, precum și SNP-urile nediferențiate pentru fiecare dintre liniile genetice.

Fiecare dintre cele 70 de mutații homoplazice, considerate pentru analiza finală, au fost găsite într-un număr variabil de genomuri analizate, de la 2 până la 285 de tulpini dintre cele 288, rezultând într-un număr total de 2624 de alele homoplazice în întreaga cohortă. Cincizeci și trei (75,7 %) dintre aceste SNP-uri (1822 de alele; 69,4 %) au fost prezente în regiunile codificatoare ale celor 25 de gene adnotate, iar 17 SNP-uri au fost găsite în regiunile intergenice. Au fost identificate 43 de SNP-uri, cu selecție pozitivă, în 15 gene care sunt asociate cu rezistența și 7 SNP-uri în 4 gene cunoscute pentru a compensa un deficit de adaptabilitate induse de mutațiile asociate cu rezistența la rifampicină (*rpoC*, *rpoB*, *rpoA*) și rezistența la PAS (*thyX*) (Figura 3).

De asemenea, au fost observate mutații homoplazice în *prpR* (Rv1129c I433T și H355R), ce reprezintă o genă asociată cu toleranța la medicamente [11], ambele mutații au evoluat independent în două izolate L2. În general, izolatele atât L2 și L4 au avut un număr median similar de SNP-uri homoplazice (9 [ÎÎC 8-10] vs 9 [ÎÎC 9-10],  $p < 0,9$ , respectiv).

A fost analizat raportul numărului SNP-uri homoplazice față de numărul total de SNP-uri diferențiatorie conform liniilor genotipice (SNP-urile filogenetice L2 și L4 nu au fost luate în considerație). În acest context, tulpinile L2, au avut un raport mai mare ( $p < 0,0001$ ) de SNP-uri homoplazice față de toate SNP-urile diferențiatorie (0,039 [ÎÎC 0,038 - 0,043] în comparație cu izolatele L4 (0,047 [ÎÎC 0,039 - 0,052]) (Figura 4A).

Această diferență se observă, de asemenea, la compararea SNP-urile homoplazice în genele de rezistență ( $p = 0,03$ ) și genele compensatorii ( $p < 0,0001$ ) care ar putea indica o selecție pozitivă crescută pentru izolatele L2 (Figura 4 B, C).

De menționat că mutația Rv2828c T141R, identificată în analiza de homoplazie din prezentul studiu și asociată anterior cu o patologie radiologică mai răspândită [11], a fost găsită aproape exclusiv în rândul



izolatelor L2 (98% în L2 față de 1,2% în L4,  $p < 0,0001$ ).

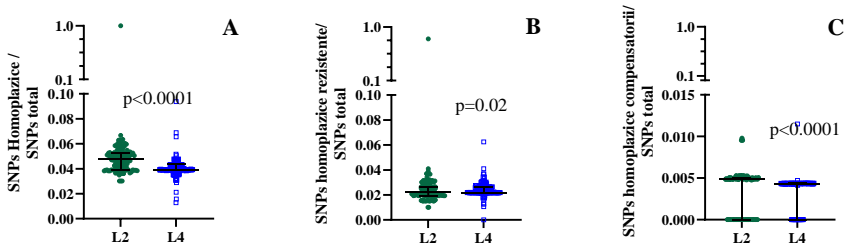


Figura 4. Homoplazia și selecția pozitivă în funcție de linia MTBC

### 2.3 Asocieri dintre determinantele genotipice cu impact asupra rezistenței la antimicrobiene a *M. tuberculosis* și evoluției clinice a tuberculozei

În cadrul studiului au fost evaluate potențiale asocieri dintre linia genotipică a *M. tuberculosis complex* și caracteristicile clinice ale bolii tuberculoase la bolnavii de la care au fost izolate tulpinile analizate. Caracteristicile clinico-demografice de bază ale lotului de bolnavi cu TB MDR de la care au fost izolate tulpinile incluse în studiu, sunt date de vârsta tânără (mediana 33 de ani [IÎC, 42-53]), genul masculin (79,2%) și prezența leziunilor cavitare la radiografia toracică (51,6%). Dintre acești bolnavi 7,4% erau HIV pozitivi. Cincizeci și nouă la sută dintre pacienți erau cazuri noi de tuberculoză. Rata de vindecare în cohorta studiată a fost de 51,8%, în timp ce cea de încheiere a tratamentului - 4,4%, cazurile de eșec au constituit 7,7%, iar cele pierdute din supraveghere și deces - 19,5% și 16,5% respectiv.

Pentru a confirma reprezentativitatea lotului selectat randomizat pentru acest studiu, au fost comparați toți parametrii clinici disponibili ai pacienților din studiu ( $n=288$ ) cu cei ai pacienților diagnosticați cu TB MDR în perioada 2013-2018, dar neincluși ( $n=5608$ ). Astfel, nu au existat diferențe semnificative în ceea ce privește genul pacienților, frecvența leziunilor cavitare și a diabetului zaharat, precum și în numărul de pacienți cu recidivă a bolii și al celor tratați după ce au fost pierduți din supraveghere. Cu toate acestea, pacienții din cohorta de studiu au fost în medie cu 3 ani mai în vârstă,

au avut o rată mai joasă a coinfecției TB/HIV, dar o rată mai mare a cazurilor noi și una mai mică a pacienților după eșec al terapiei anterioare.

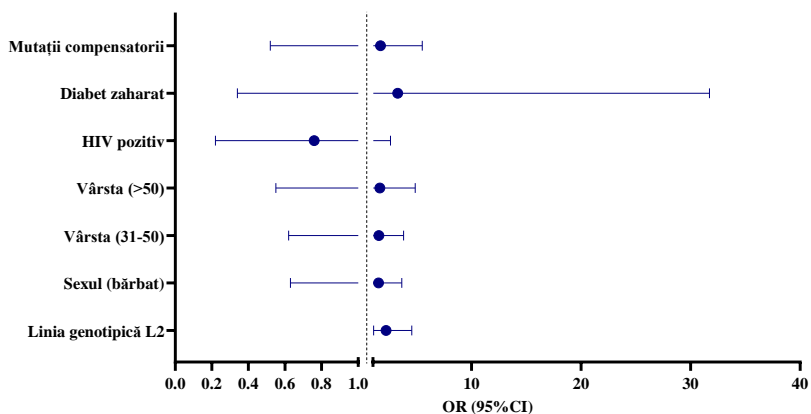


Figura 5. Asocieri cu rezultatele negative ale tratamentului, cazuri noi

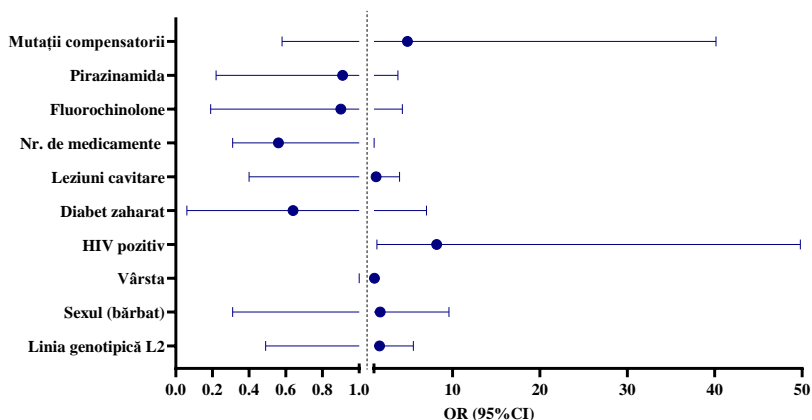


Figura 6. Asocieri cu rezultate negative ale tratamentului, cazuri noi

În regresia univariată, nu s-au observat diferențe semnificative în variabilele precum vârsta, sexul, statutul HIV, diabetul zaharat sau episoadele anterioare de TB între pacienții cu linii genotipice diferite. Cu toate acestea, analiza a arătat că pacienții infectați cu linia genotipică L2 a *M. tuberculosis complex* au avut o probabilitate mai mare de a prezenta

leziuni cavitare și o rată mai mare de eșec al tratamentului în comparație cu cei infectați cu L4. Această asociere a rămas semnificativă în cadrul modelului multivariat, covariabilele precum vârsta, sexul, statutul HIV, diabetul zaharat și prezența mutațiilor compensatorii. În primul model predictiv pentru rezultatele nefavorabile ale tratamentului antituberculos a fost demonstrată asocierea rezultatului terapiei cu vârsta (OR 1,06 per an, 95% CI 1,00-1,11,  $p=0,04$ ), și statutul HIV al bolnavului (OR 8,19, 95% CI 1,34-49,80,  $p=0,02$ ) (Figura 5).

În cel de al doilea model de regresie logistică (de asociere cu leziunile cavitare) a fost observată asocierea semnificativă cu linia genotipică L2 (OR 2,20, 95% CI 1,07-4,55,  $p=0,03$ ) (Figura 6).

### **3. DEZVOLTAREA REZISTENȚEI LA BEDAQUILINĂ A TULPINILOR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

În capitol sunt prezentate rezultatele studiului transversal de cohortă, în care a fost investigat fenomenul de dobândire a rezistenței la bedaquilină la pacienții cu TB MDR care au administrat bedaquilină în regimul de tratament, la fel, fiind analizați factorii de risc asociați cu eșecul tratamentului și deces la bolnavii care au administrat bedaquilină. În acest scop a fost efectuată secvențierea întregului genom bacterian (WGS) și fenotiparea tulpinilor de *M. tuberculosis complex* izolate din sputa pacienților TB MDR, care au primit bedaquilină în Republica Moldova în perioada 2016 - 2018.

În studiu au fost incluse probele izolate și stocate în biobanca Laboratorului Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei (LNR) din Chișinău, Republica Moldova, de la toți pacienții cu TB MDR care au început un regim de tratament cu bedaquilină în perioada 2016 - 2018, și care au avut stocat cel puțin un izolat de *M. tuberculosis complex* din sputa colectată anterior inițierii tratamentului pentru episodul respectiv de boală.

Din totalul de pacienți TB MDR tratați în perioada 2016-2018, au primit bedaquilină ca parte a regimului de tratament anti-TB MDR, 203 (6,8%) bolnavi. Astfel, în scopul studiului au fost identificate 82/203 (40,4%) de tulpini de *M. tuberculosis complex*. Izolatele de la ceilalți 121 de

pacienți nu au fost disponibile în biobanca LNR. Pentru nouă dintre acești pacienți au fost identificate doar câte un izolat din perioada de după inițierea tratamentului, motiv din care nu au fost incluși în analiza finală. La fel, izolatele de *M. tuberculosis complex* de la alți unsprezece pacienți au fost excluse din studiu deoarece nu s-a reușit creșterea lor sau erau culturi contaminate. Astfel, lotul considerat pentru analiza finală a cuprins 18 cazuri noi de TB și 44 de retratamente (total 62 izolate). Mediana vârstei bolnavilor de la care au fost izolate tulpinile analizate a fost de 39 de ani (interval între quartile (ÎIC) 34-45 de ani). Majoritatea pacienților au fost de sex masculin 50/62 (80,6%), diagnosticați cu boală cavitară 45/62 (72,6%) și HIV seronegativi 54/62 (87,1%).

Pentru a evalua reprezentativitatea lotului de studiu caracteristicile clinico-epidemiologice disponibile ale bolnavilor cu izolate incluși în studiu au fost comparate cu cele ale bolnavilor diagnosticați în perioada de referință, dar neincluși în cercetare. Caracteristicile analizate au inclus reședința, sexul, vârsta, rezultatul microscopiei, definiția cazului, statutul HIV și rezultatul tratamentului. Astfel, nu au fost observate diferențe semnificative între lotul inclus și cel neinclus în cercetare ( $p > 0,09$ ). Datele WGS a izolatelor micobacteriene analizate au evidențiat că 56,5% dintre pacienți au fost infectați cu o tulpină *M. tuberculosis complex* de linia 2 (L2) (35/62), iar ceilalți 43,5% (27/62) - cu o tulpină *M. tuberculosis complex* de linia 4 (L4).

Pe baza rezultatelor WGS, 32,3% dintre pacienți au fost clasificați ca pre-XDR\*, iar 50,0% au fost clasificați ca XDR\* înainte de începerea regimului de tratament care conținea bedaquilină (\*conform clasificării OMS până la 12/2020). Ratele de rezistență la medicamentele antituberculoase conform datelor WGS au constituit: 100% la streptomycină, 66,1% la etambutol, 71,0% la pirazinamidă, 59,7% la fluorochinolone, 72,6% la kanamicină, 24,2% la amikacină, 22,6% la capreomicină, 75,8% la etionamidă, 25,9% la acid para-aminosalicilic, 12,9% la cicloserină.

La momentul efectuării analizei statistice a datelor primare aferente studiului, 16,1% (10/62) dintre pacienți erau încă în tratament sau au fost

pierduți din supraveghere. Din cei 52 de pacienți rămași, 71,2% (37/52) au fost considerați vindecați (fără semne clinice sau microbiologice de recidivă a bolii până la 6 luni de la finalizarea tratamentului), 5,8% (3/52) au decedat, iar 23,1% (12/52) au întrunit criteriile de eșec al tratamentului, adică nu au înregistrat nici-o cultură negativă la termenul de 8 luni de la inițierea tratamentului. Ratele de eșec al tratamentului și de deces în lotul de studiu au fost comparabile cu cele în rândul pacienților TB MDR neincluși în cercetare pentru care au constituit respectiv 27,0% și 8,2%,  $p > 0,71$ .

### **Rezistența fenotipică și genotipică la bedaquilină**

În studiu au fost identificate nouă tulpini de *M. tuberculosis complex* cu mutații în genele *atpE* și/sau *Rv0678*. Un izolat avea mutații doar în *atpE*, șase tulpini aveau mutații doar în *Rv0678*, iar două tulpini prezentau mutații în ambele gene. Opt tulpini *M. tuberculosis complex* au avut o Concentrație Minimă Inhibitoare (CMI) a BDQ de 2,0 mg/L sau mai mare, conform testării în MGIT960. În același timp, un izolat (CAR-84) cu două mutații în *Rv0678* a fost testat ca fiind sensibil la bedaquilină (CMI 1,0 mg/L) (Figura 7).

De menționat că, la șapte izolate s-au identificat mai mult de o mutație în *atpE* și/sau *Rv0678* cu frecvențe diferite, sugerând existența unor subpopulații distincte la acești pacienți. Toate tulpinile *M. tuberculosis complex* rezistente la bedaquilină au fost obținute după inițierea tratamentului anti TB MDR cu un regim terapeutic care includea bedaquilină la un interval de timp de 77- 451 de zile de la inițiere.

Dintre cei 26 de pacienți cu izolate MTBC disponibile înainte și după inițierea terapiei cu bedaquilină, tulpina de bază și cea de urmărire diferă cu maximum 4 SNP. Patru pacienți (15,4%) au fost probabil reinfectați cu a doua tulpină, prezentând o diferență de 26-1126 SNP în comparație cu tulpina de bază. În total, 4/26 (15,4%) dintre tulpinile MTBC izolate au dobândit rezistență la bedaquilină după 90, 159, 348 și, respectiv, 451 de zile de administrare a bedaquilinei. Un izolat din perioada de după inițierea tratamentului (izolat de urmărire) (pacientul 29) cu mutația *atpE* p.I66M (frecvența de 97%) a fost fenotipic rezistent la bedaquilină, dar sensibil la

clofazimină.

**Tabel 1. Rezultatele testării genotipice și fenotipice la bedaquilină și clofazimină a tulpinilor de MTB izolate înainte și după includerea bedaquilinei în schema terapeutică la pacienții TB MDR, 2016 – 2018**

Nr. pacient, (ID tulpină), Timpul de colectare a probei	Rv0678 (frecvența mutației %)	atpE (frecvența mutației %)	BDQ MIC MGIT960 (mg/mL)	CFZ MIC MGIT960 (mg/mL)
Pacient29, (CAR-13), pre-expunere la bedaquilină	tulpina sălbatică	tulpina sălbatică	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
Pacient29, (CAR-38), post-expunere la bedaquilină, rezistență dobândită	tulpina sălbatică	I66M# (97%)	>2,0 (R)	≤0,5 (S)
Pacient12, (CAR-52), pre-expunere la bedaquilină	tulpina sălbatică	tulpina sălbatică	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
Pacient12, (CAR-61) post-bedaquilină, rezistență dobândită	16_del_g (57.4%); 193_del_g# (12.7%); G24D (19.8%)	tulpina sălbatică	2.0 (R)	1.0 (S)
Pacient2, (CAR-78), pre-bedaquilină	tulpina sălbatică	tulpina sălbatică	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
Pacient2, (CAR-87), post-bedaquilină, rezistență dobândită	192insG# (2%)	A63P# (25%)	>2,0 (R)	2.0 (R)
Pacient37, (CAR-10), pre-bedaquilină	tulpina sălbatică	tulpina sălbatică	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
Pacient37, (CAR-18), post-bedaquiline, re-infecție	T58P (100%)	tulpina sălbatică	2.0 (R)	1.0 (S)
Pacient57, (CAR-45), pre-bedaquilină	tulpina sălbatică	tulpina sălbatică	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
Pacient57, (CAR-55), post-bedaquilină, rezistență dobândită	193_del_g# (44.4%); S63G# (5.5%)	E61D# (27,5); I66M# (2,6%)	>2,0 (R)	1.0 (S)
Pacient32, (CAR-84), post-bedaquilină	192_ins_g# (74.2%); 193_del_g# (5.7%)	tulpina sălbatică	1.0 (S)	1.0 (S)
Pacient71, (CAR-40), post-bedaquilină	192ins_g# (23.8%); L142P (64%)	tulpina sălbatică	>2,0 (R)	2.0 (R)
Pacient61, (CAR-1), post-bedaquilină	136_ins_g (7,1%); 141_ins_c# (69,0%); 195_ins_t# (5,8%); G66W (6,0%)	tulpina sălbatică	>2,0 (R)	2.0 (R)
Pacient33, (CAR-43), post-bedaquilină	436_ins_t (90.2%); R72W (28.5%)	tulpina sălbatică	>2,0 (R)	>2,0 (R)

BDQ-bedaquilină, CFZ-clofazimină, CMI-concentrație minimă inhibitorie, R-rezistent, S-susceptibil, #mutație analizată în [2]

Un al doilea izolat de urmărire (pacientul 12) purta trei mutații în gena Rv0678 cu frecvențe variabile (p.D5fs - 57%, p.G24D - 19,8% și p.S64fs - 13%). Alte două izolate post-expunere au dobândit mutațiile atpE p.A63P (25%) în combinație cu Rv0678 p.S64fs (2%) (pacientul 2), și combinația

atpE p.E61D (28%), atpE p.I66M (3%), Rv0678 p.S63fs (5%) și p.S64fs (44%) (pacientul 57).

Printre cei patru pacienți reinfecțați cu o tulpină MTBC diferită, pacientul 37 a fost reinfecat cu o tulpină rezistentă la bedaquilină purtând mutația Rv0678 p.T58P cu o frecvență de 100%. Deși cel de-al doilea izolat avea același genotip (L 2.2.1/ Europa/Rusia W148 Outbreak), o distanță genetică de 26 SNP față de izolatul de bază a indicat clar o reinfecție (Tabel 1).

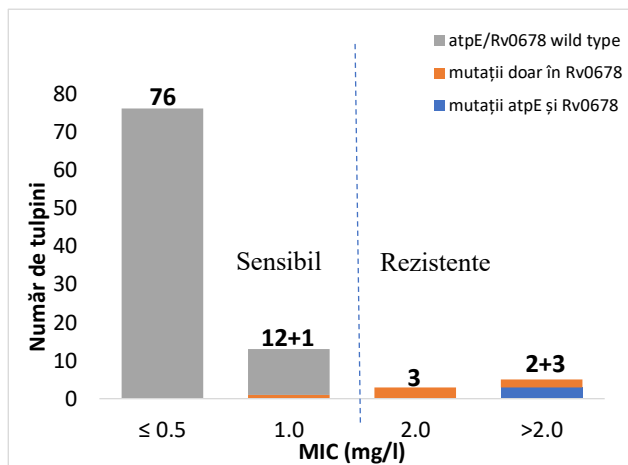


Figura 7. Distribuția concentrației minime inhibitorii (CMI) la bedaquilină pentru tulpinile MTB și rezultatele secvențierii (n=97)

În cazul altor medicamente antituberculoase nu au apărut rezistențe suplimentare la medicamente în cadrul schemelor de tratament care conțin bedaquilină, cu excepția pacientului 56, care a avut un izolat de urmărire, care a dobândit mutația *rrs* g.1484 g/t în gena ARNr 16S, ce determină rezistența încrucișată la medicamentele injectabile de linia a doua kanamicină, capreomicină și ampicilină. Cu toate acestea, a fost găsit un izolat care a pierdut practic rezistența fenotipică împotriva tuturor medicamentelor injectabile de linia a doua, precum și o mutație care determină rezistența la fluoroquinolone (pacientul 2). Izolatul inițial de la pacientul 2 conținea mutațiile *rrs* 1401 a/g (63%) și *gyrA* p. D94G (61%) în combinație cu *gyrA* p.S91P (44%). În izolatul de urmărire care a fost testat

sensibil la toate medicamentele injectabile de linia a doua, mutațiile *rrs* g. 1401 a/g și *gyrA* p.D94G au fost reduse la o frecvență de 4 % și respectiv, 0,5 %. Pe de altă parte, mutația *gyrA* p.S91P a crescut la o frecvență de 96 % (Tabel 1).

Majoritatea regimurilor de tratament au inclus antibiotice cu rezistență ce puteau fi identificate prin secvențierea genomului la momentul inițierii terapiei. De asemenea, pacienții cu rezultate nefavorabile ale tratamentului au avut în medie 2,33 medicamente inactice în regimul care includea bedaquilină, semnificativ mai multe comparativ cu pacienții cu rezultate pozitive ale tratamentului (în medie 1,27 medicamente inactice,  $p=0,02$ ). Pentru a identifica factorii de risc asociați eșecului terapiei sau mortalității la bolnavii cu regim de tratament care include bedaquilina, a fost efectuată o analiză de regresie logistică care a vizat 52 din 62 de pacienți (83,9%) pentru care datele despre rezultatele tratamentului erau disponibile.

În analiza de regresie logistică univariată, au fost incluși o serie de factori relevanți, cum ar fi linia genotipică a *M. tuberculosis complex*, sexul bolnavului, tipul cazului de tuberculoză, patern-ul XDR, prezența cavităților la radiografia toracică, statutul HIV, vârsta și numărul de medicamente cu rezistență demonstrată (medicamente inactice) care au fost incluse în regimul de tratament cu bedaquilină la pacienții cu TB MDR. Rezultatele analizei de regresie au indicat că prezența cavităților la radiografia toracică ( $p=0,011$ ) este asociată cu un rezultat nefavorabil al tratamentului. De asemenea, s-a observat că un număr mai mare de medicamente inactice în regimul cu bedaquilină a amplificat șansele de eșec al tratamentului (OR 1,92 pe unitate de creștere, 95% CI 1,15-3,21,  $p=0,012$ ).

#### **4. REZISTENȚA LA LINEZOLID A *M. TUBERCULOSIS* FACTORI DE RISC ȘI DETERMINANTE GENETICE**

În cadrul acestei analize au fost identificate toate tulpinile de MTBC izolate și stocate în perioada 2017-2018 în biobanca LNR, obținute din sputa pacienților adulți cu TB MDR, care au administrat linezolid (LNZ) în schema de tratament în orice perioadă, pe parcursul ultimilor doi ani și au avut o expunere cumulativă la linezolid mai mare de 30 de zile. De la fiecare pacient eligibil a fost inclusă doar o singură tulpină de MTBC izolată din spută.



Tulpinile MTBC incluse în studiu au fost izolate de la 52 pacienți cu vârsta medie 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 (IÎC 165 - 470,5). În același timp, numărul medicamentelor active incluse în regimul de tratament cu linezolid la pacienții analizați a fost de 3,0 (IÎC 2,0-4,0).

Rata tulpinilor MTBC izolate de la pacienții aflați în tratament după eșec a fost mai mare în cazul celor LNZ rezistente - 91,7% decât la cele LNZ sensibile - 60%. 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 (IÎC 404,5 - 705,5) față de 257,5 (IÎC 120,5 - 376,5),  $p=0,0001$  și 1,5 (IÎC 1,0 - 3,0) față de 4,0 (IÎC 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  $39,9 \pm 8,8$ ,  $p=0,01$ ).

Majoritatea tulpinilor analizate aparțin liniei genotipice L2 - 63,5%, celelalte tulpini aparținând liniei 4. WGS a confirmat profilul MDR al tuturor celor 52 de tulpini de MTBC incluse în studiu. Dintre acestea, 72% prezentau mutații compensatorii în genele *rpoA* și *rpoC*.

Conform datelor secvențierii, 12 (23,1%) tulpini MTBC au fost rezistente la linezolid. Numărul de tulpini cu rezistență genotipică la linezolid (12/52) diferă de cel detectat prin TSM fenotipic bazat pe cultură, care a evidențiat 15 tulpini rezistente la linezolid. Această diferență este determinată de unele mutații genice specifice, cum ar fi substituția (T460C) în gena *rplC* și alte mutații în genele *rrl*. Pentru 8 tulpini rezistente la linezolid, a fost găsită mutația de tip substituție (T460C) în gena *rplC*, în timp ce în cazul altor 4 tulpini au existat mai multe mutații de tip substituție în diferite poziții ale genei *rrl* (*Rvnr02*) ce codifică proteina ribozomală L4.

În cazul unei singure tulpini cu rezistență fenotipică la linezolid nu s-a găsit nici o mutație în genele *rplC* și *rrl*, în timp ce la o altă tulpină cu

rezistență fenotipică au fost detectate 2 mutații de tip substituție nucleotidică în diferite poziții a genei rrl: 2814G>T (98%); 2810A>C (98%), la ambele tulpini nu au fost găsite mutații în gena rplC.

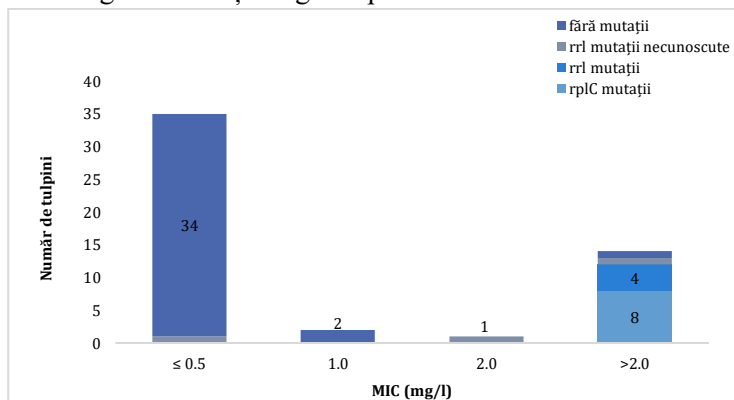


Figura 8. Distribuția concentrațiilor minime inhibitorii (CMI) la linezolid pentru tulpinile MTBC și rezultatele secvențierii

Pentru alte 2 tulpini sensibile fenotipic au fost identificate mutațiile 2691A>T (100%), 219G>C (1,3%) care nu au fost descrise anterior în literatură, motiv din care au fost apreciate ca tulpini sensibile la linezolid.

Toate tulpinile cu mutații rezistente în gena rplC au avut o 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 8).

De menționat că o proporție semnificativă (76,9%) dintre tulpinile rezistente la linezolid prezentau și rezistență suplimentară la fluorochinolone.

Pentru identificarea factorilor de risc asociați cu rezistența la linezolid a tulpinilor MDR ale MTBC inițial au fost evaluați prin regresie logistică univariată următoarele variabile clinico-microbiologice: genul, vârsta, locul de reședință, prezența cavitaților la radiografie, linia genotipică a MTBC, 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 în baza datelor de secvențiere) și statutul HIV (Figura 9).

Dintre variabilele analizate, patru au prezentat o asociere semnificativă în analiza univariată - vârsta pacientului, numărul de doze de linezolid administrate, numărul de medicamente din schema de tratament, statutul HIV ( $p < 0,25$ ).

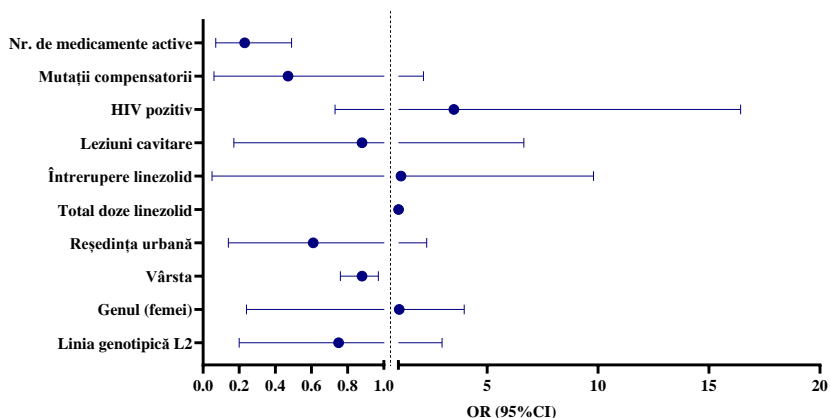


Figura 9. Factori de risc pentru rezistența la linezolid

Ulterior acestea au fost verificate în cadrul unui model de regresie logistică multivariată care a evidențiat asocierea semnificativă dintre 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;  $p = 0,03$ ). În același timp, nu au fost evidențiate asocieri semnificative pentru ceilalți doi factori testați (vârsta și statutul HIV).

În baza datelor WGS, a fost determinat că mediana numărului de medicamente active din schemele de tratament este semnificativ mai mică decât numărul calculat pe baza rezultatelor testelor de sensibilitate fenotipică și a prezumției de sensibilitate la medicamentele netestate. Aceasta înseamnă că, în practică, pacienții primesc un număr mai mic de medicamente active decât cel estimat inițial pe baza testelor de laborator.

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

### Concluzii

1. Tulpinile MDR de *Mycobacterium tuberculosis complex* din Republica Moldova sunt predominant reprezentate de genotipurile L2 și L4 (Ural), proporția lor rămânând stabilă în perioada de observație de șase ani din prezenta lucrare.
2. Există diferențe semnificative în rezistența fenotipică precum și determinantele genotipice la medicamentele antituberculoase între liniile genotipice L2 și L4 de *Mycobacterium tuberculosis complex*, indicând diferențele de adaptabilitate a acestor linii la tratamentele aplicate.
3. Tuberculoza pulmonară cauzată de tulpinile L2 este asociată cu caracteristici clinice mai severe, cum ar fi o frecvență mai mare a leziunilor cavitare și a rată mai mare a eșecului terapiei, în comparație cu tulpinile L4, fiind observată și o determinantă genetică a acestui fapt.
4. Linia L4 prezintă o rată mai ridicată de rezistență și transmitere, posibil datorită prezenței unor mutații compensatorii care favorizează adaptarea bacteriei la tratamentele antituberculoase.
5. Achiziționarea rezistenței la noile preparate antituberculoase, precum bedaquilina, apare în scurt timp de la introducerea în practica clinică. Aceasta poate atinge rata de până la 15% în cazul pacienților cu tuberculoză MDR, eșecul terapiei la acești pacienți fiind asociat cu prezența bolii cavitare și numărul redus de medicamente cu sensibilitate confirmată din schema de tratament.
6. Rezistența la linezolid a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis complex* este frecventă la pacienții tratați anterior cu acest medicament, fiind asociată cu un număr suboptimal de medicamente active în schema anterioară de tratament antituberculos care conținea linezolid.

### Recomandări

1. Implementarea unei supravegheri și monitorizări sistematice a tulpinilor MDR de *Mycobacterium tuberculosis complex*, cu accent pe genotipurile

L2 și L4, pentru a identifica evoluția rezistenței la medicamente și a ghida strategiile terapeutice.

2. Dezvoltarea unei abordări personalizate a tratamentului antituberculos, luând în considerare mutațiile specifice ale tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis complex*, pentru a maximiza eficacitatea terapeutică și a minimiza riscul de achiziționare a rezistenței.
3. Implementarea tehnicilor moleculare rapide, potențial pe bază de secvențiere a genomului micobacterian, pentru detectarea sensibilității *Mycobacterium tuberculosis complex* la spectrul complet de medicamente antituberculoase aplicate în tratamentul tuberculozei MDR.
4. Respectarea ghidurilor curente pentru tratamentul tuberculozei MDR inclusiv asigurarea unui număr suficient de medicamente pentru a preveni rezistența secundară față de medicamentele antituberculoase cheie.

### BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. În *Glob Tuberc Rep*, <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021> (2021, accessed 1 March 2022).
2. Uplekar M. et al. WHO's new End TB Strategy. În *Lancet* 2015, nr. 385, pp. 1799–1801. ISSN01406736.
3. Lange C. et al. Management of drug-resistant tuberculosis. În *Lancet* 2019, nr. 394, pp. 953–966.
4. Qin Z.Z. et al. How is Xpert MTB/RIF being implemented in 22 high tuberculosis burden countries? În *Eur Respir J* 2015, nr. 45, pp. 549–54. ISSN1399-3003.
5. Lisboa M. et al. Time delay and associated mortality from negative smear to positive Xpert MTB/RIF test among TB/HIV patients: A retrospective study 11 Medical and Health Sciences 1103 Clinical Sciences 11 Medical and Health Sciences 1117 Public Health and Health Services. În *BMC Infect Dis* 2019, nr. 19, pp. 18. ISSN14712334.
6. Catanzaro A. et al. Performance Comparison of Three Rapid Tests for the Diagnosis of Drug-Resistant Tuberculosis. În *PLoS One* 2015, nr. 10, pp. e0136861. ISSN1932-6203.

7. Law Y.N. et al. Low cost automated whole smear microscopy screening system for detection of acid fast bacilli. *În PLoS One* 2018, nr. 13, pp. e0190988. ISSN1932-6203.
8. Sudbury E.L. et al. Mycobacterium tuberculosis-specific cytokine biomarkers to differentiate active TB and LTBI: A systematic review. *În J Infect* 2020, nr. 81, pp. 873–881. ISSN1532-2742.
9. Lange C. et al. Perspective for Precision Medicine for Tuberculosis. *În Front Immunol*, nr. 11. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.566608. ISSN16643224.
10. Millington K.A. et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. *În J Immunol* 2007, nr. 178, pp. 5217–5226. ISSN0022-1767.
11. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4, Treatment: drug-resistant tuberculosis treatment. pp. 98.
12. Ahmad N. et al. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *În Lancet* 2018, nr. 392, pp. 821–834. ISSN1474547X.
13. Günther G. et al. Defining Outcomes of Tuberculosis (Treatment): From the Past to the Future. *În Respiration* 2021, nr. 100, pp. 843–852. ISSN0025-7931.
14. Lange C. et al. Time to revise WHO-recommended definitions of MDR-TB treatment outcomes. *În Lancet Respir Med* 2018, nr. 6, pp. 246–248. ISSN2213-2619.

## LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE

- **Articole în reviste științifice peste hotare:**
  - ✓ **articole în reviste ISI, SCOPUS și alte baze de date internaționale\***
  - 1. **Chesov, E.**, Chesov, D., Reiman, M., Dreyer V., Utpatel, C., Groschel M., Ciobanu N., Crudu, V., Lange, C., Heyckendorf, J., Merker, M. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* strain type on multidrug-resistant tuberculosis severity, Republic of Moldova. In Journal of Infection, 2023, no 87(6), pp 588-591. ISSN 0163-4453. (IF: 28,2)
  - 2. **Chesov, E.**, Chesov, D., Maurer, F. P., Andres, S., Utpatel, C., Barilar I., Donica, A., Reimann, M., Niemann, S., Lange, C., Crudu, V., Heyckendorf, J., Merker, M. Emergence of bedaquiline resistance in a high tuberculosis burden country. In: *Eur Respir J.* 2022, no. 59(3) 2100621. ISSN 0903-1936. (IF 33,8)
  - 3. Chesov, D., Heyckendorf, J., Alexandru, S., Donica, A., **Chesov, E.**, Reimann, M., Crudu, V., Botnaru, V., Lange, C. Impact of bedaquiline on treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis in a high-burden country. In: *Eur Respir J.* 2021, no. 57(6) 2002544. ISSN 0903-936. (IF 16,67)
- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**
  - ✓ **articole în reviste de categoria B**
  - 1. **Chesov, E.**, Ciobanu, N., Chesov, D., Lange C., Heyckendorf, J., Merker, M., Crudu, V. Rezistența *Mycobacterium tuberculosis* la linezolid - mutații asociate și factori de risc: studiu transversal, retrospectiv, analitic. În: Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2021, nr. 26, pp. 43-56. ISSN 2345-1467.
  - 2. **Chesov, E.**, Balan, G., Ciobanu, N., Racovita, S., Crudu, V. Concordanța profilurilor de rezistență în cazurile secundare versus cazurile index. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale. 2018, 1(58), pp. 115-120. ISSN 1857-0011.
- **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice internaționale**
  - 1. **Chesov, E.**, Chesov, D., Ciobanu, N., Crudu, V., Niemann, S., Lange, C., Heyckendorf, J. Genotypic diversity and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Republic of Moldova, 53rd Union World Conference on Lung Health. In: Int J Tuberc Lung Dis. 2022, no. 26 (11 S2), p. S283. ISSN: 1027-3719.
  - 2. Turcu, E., **Chesov, E.**, Crudu, V. Molecular genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Al-Farabi international congress on applied sciences - II 'Nakhchivan' University, Azerbaijan, abstract book, 2021, p. 210. ISBN: 978-625-7898-41-6

3. Chesov, D., Heyckendorf, J., Rusu, D., Munteanu, O., **Chesov, E.**, Cozlovski, V., Crudu, V., Lange, C., Botnaru, V. Role of bronchial aspirate samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with negative smear and negative Xpert MTBC/Rif in sputum. In: Eur Respir J. 2020, no. 56, p. 530.
  4. Chesov, D., Heyckendorf, J., Reiman, M., Alexandru, S., Donica, A., **Chesov, E.**, Crudu, V., Botnaru, V., Lange, C. Treatment outcome in patients with MDR-TB treated with bedaquiline containing regimens, Republic of Moldova. In: Eur Respir J. 2020, no. 56 (suppl. 64), p. 474.
  5. **Chesov, E.**, Balan, G., Ciobanu, N., Chesov, D., Crudu, V. *Mycobacterium tuberculosis* resistance profiles in index and secondary TB cases from the same household. In: Eur Respir J. 2018, no. 52 (suppl. 62), PA2687.
- **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice naționale**
    1. Chesov, D., **Chesov, E.**, Crudu, V., Botnaru, V., Merker, M., Lange, C. Diversitatea genotipică a *M. tuberculosis* și caracteristicile clinice în tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2023, nr.10 (3) An. 1, p189. ISSN 2345-1467.
    2. **Chesov, E.**, Ciobanu, N. Molecular resistance characteristics of *Mycobacterium tuberculosis complex* lineages in the Republic of Moldova. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2022, nr. 3 An.1(29), p. 118. ISSN 2345-1467.
    3. **Chesov, E.**, Ciobanu, N., Crudu, V. Genetic mutations associated with reduced linezolid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. În: *Culegere de rezumate științifice. Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților. IP USMF "Nicolae Testemițanu"*, Chișinău, 2021, p.89. ISBN 978-9975-82-223-7.
    4. **Chesov, E.** Corelarea rezistenței genotipice cu cea fenotipică a tulpinilor de *Mycobacterium Tuberculosis* multidrog rezistente. În: *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: USMF, 2020, p. 172.
    5. Osmatescu, A., **Chesov, E.** Additional second line tb drug resistance in high burden MDR TB setting. In: *MedEspera International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chișinău: 2018, pp. 86-87.
  - **Participări cu comunicări la forumuri științifice:**
    - **internaționale**
      1. Turcu, E., **Chesov, E.** Molecular genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Al-Farabi congress on applied sciences - II 'Nakhchivan' University*. Azerbaijan, May 2-4, 2021.
      2. **Chesov, E.** Molecular typing. Bases of the techniques. Main lineages identified. *TBnet Academy*. București, 12-15 mai 2019.
    - **naționale**



1. Chesov, E., Diversitatea genotipică și rezistența la *M. tuberculosis*. *Conferința cu genericul "Noi abordări în controlul bolilor respiratorii. Integrarea serviciilor", Institutul de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc"*. Chișinău, 20-21 decembrie 2023.
  2. Chesov, D., **Chesov, E.**, Crudu, V., Botnaru, V., Merker, M., Lange C. Diversitatea genotipică a *M. tuberculosis* și caracteristicile clinice în tuberculoză pulmonară multidrog rezistentă. *Conferința științifică anuală, Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță, USMF., Nicolae Testemițanu*". Chișinău, 18-20 octombrie 2023.
  3. **Chesov, E.**, Ciobanu, N. Caracteristica rezistenței moleculare a liniilor de *Mycobacterium tuberculosis complex* în Republica Moldova. *Conferința științifică anuală, Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță, USMF., Nicolae Testemițanu*". Chișinău, 19-21 octombrie 2022.
  4. **Chesov, E.**, Ciobanu, N., Crudu, V. Mutații genetice asociate cu sensibilitatea redusă la linezolid a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis*, *Conferința științifică anuală, Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță, USMF., Nicolae Testemițanu*". Chișinău, 20-22 octombrie 2021.
  5. **Chesov, E.** Corelarea rezistenței genotipice cu cea fenotipică a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis* multidrog rezistente, *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea a USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, 21-23 octombrie 2020.
  6. **Chesov, E.** Markerii genetici asociați eficacității tratamentului antituberculos. *Conferința științifică anuală, consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu*. Chișinău, 16-20 octombrie 2017.
- **Participări cu postere la foruri științifice:**
    - internaționale**
    - 1. **Chesov, E.**, Chesov, D., Ciobanu, N., Crudu, V., Niemann, S., Lange, C., Heyckendorf, J. Genotypic diversity and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Republic of Moldova. *53rd Union World Conference on Lung Health*, EP-24-838, november 8-11, 2022.
    - 2. **Chesov, E.**, Balan G., Ciobanu, N., Chesov, D., Crudu, V. *Mycobacterium tuberculosis* resistance profiles in index and secondary TB cases from the same household. *Congresul Internațional al Societății de Respirologie*. Paris, 15-19 septembrie 2018.
    - naționale**
    - 1. **Chesov, E.** Evoluția liniilor de *M. tuberculosis* în Republica Moldova din perspectiva rezistenței la medicamente. *Conferința națională cu participare internațională Abordarea o singură sănătate-realizări și provocări, ediția a II-a*. Chișinău, 23-24 noiembrie 2023.

2. Osmotescu, A., **Chesov, E.** Additional second line TB drug resistance in high burden MDR TB setting. *MedEspera 2018 The 7th International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chișinău, 3-5 mai 2018.
- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**
    - ✓ **Certificate de inovator**
      1. **Chesov E.**, Ciobanu N., Rusu D., Crudu V. Testarea fenotipică a sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la linezolid cu aplicarea diluțiilor seriale de antibiotic. Nr. 6186 din 13.02.2024, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”
      2. **Chesov E.**, Ciobanu N., Rusu D., Crudu V. Testarea fenotipică a sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la bedaquilină cu aplicarea diluțiilor seriale de antibiotic. Nr. 6187 din 13.02.2024, înregistrat la USMF „Nicolae Testemițanu”
    - ✓ **Acte de implementare**
      1. **Chesov E.**, Ciobanu N., Rusu D., Crudu V. Testarea fenotipică a sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la linezolid cu aplicarea diluțiilor seriale de antibiotic. Nr. 29 din 13.02.2024.
      2. **Chesov E.**, Ciobanu N., Rusu D., Crudu V. Testarea fenotipică a sensibilității *Mycobacterium tuberculosis* la bedaquilină cu aplicarea diluțiilor seriale de antibiotic. Nr. 28 din 13.02.2024.

## ADNOTARE

Elena Chesov

### „Diversitatea genotipică și rezistența la medicamente a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis*”

Teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2024

**Structura tezei:** introducerea, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 210 surse, două anexe, 15 tabele și 22 figuri. Rezultatele sunt publicate în 15 lucrări științifice.

**Cuvinte cheie:** TB, *M. tuberculosis complex*, MDR, diagnostic de laborator, tratament antituberculos, secvențierea întregului genom, factori de risc, linii genotipice.

**Domeniul de studiu:** 313.02 – Microbiologie, virusologie medicală.

**Scopul lucrării:** De a studia diversitatea genotipică și caracteristicile molecular-genetice ale tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis* din Republica Moldova cu impact asupra fenomenului de rezistență.

**Obiectivele lucrării:** 1. Aprecierea diversității genotipice și a evoluției temporale a tulpinilor multidrog-rezistente de *Mycobacterium tuberculosis* în Republica Moldova. 2. Identificarea determinantelor genetice ale *Mycobacterium tuberculosis* cu rol putativ în răspândirea tulpinilor multidrog-rezistente în Republica Moldova. 3. Stabilirea potențialelor asocieri dintre determinantele genotipice cu impact asupra rezistenței la antimicrobiene a *Mycobacterium tuberculosis* și evoluția clinică a tuberculozei. 4. Identificarea corespondențelor genotipice ale rezistenței micobacteriene la medicamentele cheie utilizate în tratamentul tuberculozei multidrog-rezistente.

**Noutatea și originalitatea științifică:** Rezultatele prezentului studiu descriu diversitatea genotipică a *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova în baza analizei datelor de secvențiere a întregului genom micobacterian (Whole Genome Sequencing) obținute în baza unui lot de izolate micobacteriene selectate dintr-o perioadă de timp semnificativ mai lungă (6 ani) decât în studiile anterioare. Utilizând același set de date de secvențiere a fost analizat pentru prima dată un lot de izolate *M. tuberculosis complex* provenit din Europa de Est, a fost determinat rolul putativ al mutațiilor compensatorii și a unor mutații homoplazice în evoluția endemică de TB MDR în această regiune. La fel, elementul novatoriu al lucrării este asigurat de evidențierea asocierilor dintre deficiențele de management clinic și apariția rezistenței la preparatele antituberculoase, la bolnavii TB, tratați în cadrul Programului național de răspuns la tuberculoză din Republica Moldova.

**Rezultatele noi pentru știință și practică:** Majoritatea covârșitoare a tulpinilor MDR de *M. tuberculosis complex* circulante în Republica Moldova aparțin într-o proporție relativ stabilă (pe durata observată în studiu) liniilor genotipice L2 și L4, care manifestă diferențe semnificative în rezistența la medicamentele antituberculoase. Tulpinile MDR ale *M. tuberculosis complex* ce aparțin liniei genotipice L2, circulante în Republica Moldova, se caracterizează prin forme cu leziuni imagistice mai severe de tuberculoză pulmonară, fapt asociat cu prezența în genomul micobacterian a mutației Rv2828c T141R, fiind observată o selecție pozitivă pentru această mutație. Tulpinile MDR ale *M. tuberculosis complex* ce aparțin liniilor genotipice L4, circulante în Republica Moldova, se caracterizează printr-o rată deosebit de mare de transmitere în populație, unul dintre factorii potențiali asociați cu succesul epidemiologic al acestor tulpini fiind prezența mutațiilor compensatorii pentru rifampicină în gena *rpoC* a micobacteriei.

În condițiile managementului programatic al bolnavilor de tuberculoză în Republica Moldova, rezistența tulpinilor de *M. tuberculosis complex* la medicamentele noi și repropuse precum bedaquilina și linezolidul este achiziționată secundar tratamentului TB MDR prin aplicarea unor scheme de tratament deficitare.

**Semnificația teoretică:** Rezultatele acestei lucrări oferă argumentarea teoretică pentru succesul răspândirii liniilor filogenetice de *M. tuberculosis complex* L2 și L4 în Republica Moldova, în special identificând unele determinante genetice asociate cu selecția pozitivă a genotipurilor L2 precum și a altora care avantajează răspândirea genotipurilor L4. La fel, teza aduce ilustrarea teoretică a achiziționării rezistenței la medicamentele antituberculoase noi, secundar includerii acestora în scheme terapeutice deficitare utilizate la bolnavii de TB MDR.

**Valoarea aplicativă:** Datele privitor la particularitățile corelației rezistenței geno-fenotipice și diferențele acestora dintre cele două genotipuri identificate (L2 și L4) în prezentul studiu își pot găsi aplicația în perfecționarea metodelor de testare a sensibilității la medicamente a tulpinilor *M. tuberculosis complex*, îmbunătățirii anchetării epidemiologice a focarelor de tuberculoză și identificarea măsurilor de reducere a riscurilor de achiziționare a rezistenței la medicamentele antituberculoase.

**Implementarea rezultatelor:** Rezultatele tezei au fost implementate în cadrul Laboratorului Național de referință în Microbiologia Tuberculozei din cadrul Institutului de fiziopneumologie ”Chiril Draganiuc”, fiind obținute două acte de implementare în procesul științifico-practic și două certificate de inovator.

## АННОТАЦИЯ

Елена Кесов

### "Генотипическое разнообразие и лекарственная устойчивость штаммов *Mycobacterium tuberculosis*."

Диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2024 год.

**Структура диссертации:** введение, четыре главы, общие выводы и рекомендации, библиография из 210 источников, два приложения, 15 таблиц и 22 рисунков. Результаты диссертации опубликованы в 15 работах.

**Ключевые слова:** ТБ, *M. tuberculosis*, МЛУ, лабораторная диагностика, противотуберкулезное лечение, полногеномное секвенирование, факторы риска, генотипические линии.

**Область исследования:** 313.02 – Микробиология, медицинская вирусология.

**Цель работы:** Изучение генотипического разнообразия и молекулярно-генетических характеристик штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Молдова, влияющих на лекарственную устойчивость.

**Задачи работы:** 1. Оценка генетического разнообразия и временной эволюции штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью в Республике Молдова. 2. Идентификация генетических детерминант *Mycobacterium tuberculosis*, играющих роль в распространении штаммов с множественной лекарственной устойчивостью в Республике Молдова. 3. Установление потенциальных ассоциаций между генетическими детерминантами, влияющих на лекарственную устойчивость *Mycobacterium tuberculosis*, и клиническим течением туберкулеза. 4. Идентификация генетических изменений обуславливающих устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к ключевым препаратам, используемым в лечении туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

**Научная новизна и оригинальность:** Результаты данного исследования описывают генотипическое разнообразие *M. tuberculosis complex* в Республике Молдова на основе анализа данных полногеномного секвенирования *M. tuberculosis complex* (Whole Genome Sequencing), полученных на основе выборки микобактериальных штаммов, за значительно более длительный период (6 лет) по сравнению с предыдущими исследованиями. Кроме того, впервые была определена потенциальная роль компенсаторных мутаций и гомоплазматических мутаций в эволюции эндемии МЛУ ТБ в этом регионе. Также инновационный элемент работы состоит в выявлении ассоциаций между отрицательными клиническими проявлениями туберкулеза и появлением устойчивости к противотуберкулезным препаратам у пациентов с ТБ, леченных в рамках Национальной Программы по Борьбе с Туберкулезом в Республике Молдова.

**Новые результаты для науки и практики:** Подавляющее большинство МЛУ штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующие в Республике Молдова, принадлежат к генотипическим линиям L2 и L4, в относительно стабильном соотношении (на протяжении наблюдаемого периода в данном исследовании), которые характеризуются значительными различиями в резистентности к противотуберкулезным препаратам. МЛУ штаммы *M. tuberculosis*, принадлежащие генотипической линии L2, циркулирующие в Республике Молдова, характеризуются более тяжелыми радиологическими поражениями легких, что связано с наличием мутации Rv2828c T141R в микобактериальном геноме, с наблюдением положительной селекции для этой мутации. МЛУ штаммы *M. tuberculosis*, принадлежащие генотипической линии L4, циркулирующие в Республике Молдова, характеризуются особенно высокой степенью передачи в населении, одним из потенциальных факторов, ассоциированных с эпидемиологическим успехом этих штаммов, является наличие компенсаторных мутаций для рифампицина в гене *groS* микобактерии.

В условиях программного лечения больных туберкулезом в Республике Молдова резистентность штаммов *M. tuberculosis complex* к новым и препаратам, таким как бекваквлин и линезолид, приобретает вторично во время лечения МЛУ ТБ вследствие применения неполноценных схем лечения.

**Теоретическое значение:** Результаты данной работы предоставляют аргументы, объясняющие успех распространения филогенетических линий L2 и L4 *M. tuberculosis complex* в Республике Молдова, в частности, были идентифицированы генетические особенности, ассоциированные с положительной селекцией генотипов L2, а также те, которые способствуют распространению генотипов L4. Также диссертация дает теоретическое объяснение приобретенной резистентности к новым противотуберкулезным препаратам, вторично использованию неполноценных терапевтических схем лечения, у больных с МЛУ ТБ.

**Прикладная ценность:** Данные касающиеся корреляции гено-фенотипической устойчивости и их различий между двумя выявленными генотипами (L2 и L4) полученные в данном исследовании могут быть применены для улучшения методов тестирования чувствительности штаммов *M. tuberculosis complex* к противотуберкулезным препаратам. Также представление данные могут быть применены для улучшения эпидемиологического исследования очагов туберкулеза и выявления мер по снижению рисков приобретения устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

**Внедрение результатов:** Результаты диссертации были внедрены в Национальной Лаборатории по Микробиологии Туберкулеза при Институте Фтизиатрии и Монографии им. Кирилы Драганюка, в Кишиневе Республика Молдова. Также были получены два свидетельства о внедрении результатов диссертации в научно-практический процесс и два сертификата о инновации.

## SUMMARY

Chesov Elena

### "Genotypic Diversity and Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Strains"

PhD Thesis in Medical Sciences, Chisinau, 2024

**Thesis structure:** introduction, four chapters, general conclusions and recommendations, bibliography 210 sources, two annexes, 15 tables, and 22 figures. The results are published in 15 papers.

**Keywords:** TB, *M. tuberculosis*, MDR, laboratory diagnostics, anti-tuberculosis treatment, whole genome sequencing, risk factors, genotypic lineages.

**Field of study:** 313.02 – Microbiology, medical virology.

**Aim:** To study the genotypic diversity and molecular-genetic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* strains from the Republic of Moldova with impact on mycobacterial drug resistance.

**Objectives:** 1. To assess the genotypic diversity and temporal evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Republic of Moldova. 2. To identifying the genetic determinants of *Mycobacterium tuberculosis* potentially involved in the spread of multidrug-resistant strains in the Republic of Moldova. 3. To establish potential associations between genotypic determinants impacting the antimicrobial resistance of *Mycobacterium tuberculosis* and the clinical evolution of tuberculosis. 4. To identify genotypic correlates of mycobacterial resistance to key drugs used in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis.

**Scientific novelty and originality:** The results of the present study describe the genotypic diversity of *M. tuberculosis complex* in the Republic of Moldova based on the analysis of Whole Genome Sequencing data obtained from a set of mycobacterial isolates selected over a significantly longer period (6 years) than in previous studies. Additionally, for the first time on a set of *M. tuberculosis complex* isolates from Eastern Europe, the putative role of compensatory and homoplastic mutations in the evolution of the MDR-TB endemic in this region, was determined. Likewise, the work is ensured highlights the associations between clinical management deficiencies and the emergence of resistance to anti-tuberculosis drugs in TB patients treated under the National Tuberculosis Response Program in the Republic of Moldova.

**New results for science and practice:** The overwhelming majority of MDR *M. tuberculosis complex* strains circulating in the Republic of Moldova belong in a relatively stable proportion (over the study period) to genotypic lineages L2 and L4, with significant differences in resistance to anti-tuberculosis drugs. MDR strains of *M. tuberculosis complex* belonging to genotypic lineage L2, circulating in the Republic of Moldova, are characterized by more severe radiographic lesions in pulmonary tuberculosis, a fact associated with Rv2828c T141R mutation in the mycobacterial genome, with positive selection observed for this mutation. MDR strains of *M. tuberculosis complex* belonging to genotypic lineage L4, circulating in the Republic of Moldova, are characterized by a particularly high rate of transmission in the population, one of the potential factors associated with the epidemiological success of these strains being the presence of compensatory mutations for rifampicin in the *rpoC* gene of the mycobacterium. Under the conditions of programmatic management of tuberculosis patients in the Republic of Moldova, resistance of *M. tuberculosis complex* strains to new and repurposed drugs such as bedaquiline and linezolid is acquired secondary to TB MDR treatment through the application of deficient treatment regimens.

**Theoretical significance:** The results of this work provide putative theoretical explanation for the successful spread of phylogenetic lines of *M. tuberculosis complex* L2 and L4 in the Republic of Moldova, especially by identifying some genetic determinants associated with positive selection of L2 genotypes as well as others that potentially favor the spread of L4 genotypes. Likewise, the thesis provides theoretical illustration of the acquisition of resistance to new anti-tuberculosis drugs, secondary to their inclusion in deficient therapeutic MDR-TB treatment regimens.

**Applicative value:** The data regarding the peculiarities of the correlation between geno-phenotypic resistance and their differences between the two identified genotypes (L2 and L4) in this study can be applied to improve methods for testing the susceptibility of *M. tuberculosis complex* strains to anti-tuberculosis drugs. Improving the epidemiological investigation of tuberculosis outbreaks and identifying measures to reduce the risks of acquiring resistance to anti-tuberculosis drugs.

**Implementation of results:** The results of the thesis have been implemented at the National Reference Laboratory for Tuberculosis Microbiology at the Chiril Draganiuc Institute of Phthisiopneumology, resulting in two implementation and innovation certificates.

**ELENA CHESOV**

**DIVERSITATEA GENOTIPICĂ ȘI REZISTENȚA  
LA MEDICAMENTE A TULPINILOR DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

313.02 – MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 28.08.2024

Formatul hârtiei: A4

Hârtie ofset. Tipar digital

Tiraj: 50

Coli de tipar: 2,5

Comanda nr.112

Tipografia: SRL „Print-Caro”  
mun. Chișinău , str. Columna 170  
tel.: 069220081