

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

Teză 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.

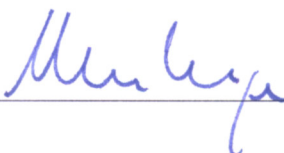
Conducător științific

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



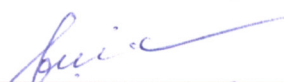
Conducător prin cotutelă

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:

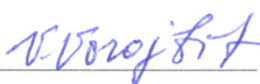
Președinte:


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

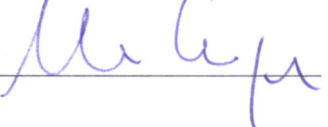


Membrii

Vorojbit Valentina,
dr. șt. med., conf. univ.
Crudu Valeriu,
dr. șt. med., conf. cercet.
Lange Christoph,
profesor universitar, dr. hab. șt. med.



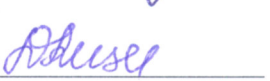




Referenți oficiali:


Greta Bălan,
dr. hab. șt. med, conf. univ.
Rusu Doina,
dr. șt. med., conf. univ.
Burduniunc Olga,
dr. hab. șt. med., conf. univ.







Autor
Chesov Elena



© Chesov Elena, 2024

CUPRINS

LISTA FIGURILOR.....	7
LISTA TABELELOR.....	8
LISTA ABREVIERILOR.....	5
INTRODUCERE	9
1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS - DETERMINANTE GENETICE ASOCIERI EPIDEMIOLOGICE ȘI CLINICE.....	16
1.1 Povara epidemiologică asociată infecției cu <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	16
1.2 Identificarea și aprecierea sensibilității față de medicamentele antituberculoase a tulpinilor de <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	17
1.3 Liniile filogenetice ale <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> - particularități epidemiologice și caracteristici clinice.....	24
1.4 Heterogenitatea genetică a <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> și dezvoltarea rezistenței la preparatele antituberculoase.....	29
2. DIVERSITATEA GENOTIPICĂ A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ÎN REPUBLICA MOLDOVA ÎN CONTEXTUL DEZVOLĂȚII REZISTENȚEI ANTIMICORBINE ȘI AL CARACTERSTICILOR CLINICE ALE BOLII	36
2.1 Material și metode.....	36
2.2 Reconstrucția filogenetică și transmiterea tulpinilor <i>M. tuberculosis complex</i> rezistente la medicamente în Republica Moldova, 2013-2018	40
2.3 Determinante genetice ale <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cu rol potențial în răspândirea tulpinilor multidrog-rezistente în Republica Moldova	47
2.4 Sinteza și interpretarea rezultatelor evaluării diversității genotipice a <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> în contextul dezvoltării rezistenței antibacteriene și prezentării clinice a bolii	58
3. DEZVOLTAREA REZISTENȚEI LA BEDAQUILINĂ A TULPINILOR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ÎN REPUBLICA MOLDOVA	61
3.1 Material și metode.....	62
3.2 Rezultatele aprecierii rezistenței genotipice și fenotipice la bedaquilină.....	66

3.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor privitor la achiziționarea rezistenței la bedaquilină a tulpinilor de <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	73
4. REZISTENȚA LA LINEZOLID A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FACTORI DE RISC ȘI DETERMINANTE GENETICE	77
4.1 Material și metode.....	78
4.2 Rezultatele aprecierii rezistenței genotipice și fenotipice la linezolid a <i>M. tuberculosis complex</i> multidrog rezistente	80
4.3 Factorii de risc asociați cu rezistența la linezolid a tulpinilor de <i>M. tuberculosis complex</i> multidrog rezistente	85
4.4 Sinteza și interpretarea rezistenței la linezolid a <i>M. tuberculosis complex</i> , factori de risc și determinante genetice	88
CONCLUZII GENERALE.....	91
BIBLIOGRAFIE.....	93
Anexa 1 Mutații rezistente la medicamente în funcție de linia <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	107
Anexa 2 Caracteristicile locilor homoplazici.....	111
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI MANIFESTĂRILOR ȘTIINȚIFICE.....	117
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	121
CURRICULUM VITAE.....	127

LISTA ABREVIERILOR

ADN	Acid dezoxiribonucleic
AMK	Amicacină
ATP	Adenozin trifosfat
BAAR	Bacili acido-alcool rezistenți
BDQ	Bedaquilină
CAP	Capreomicină
CCM	Concentrație critică a medicamentului
CFZ	Clofazimină
CI	Intervalul de încredere
CS	Cicloserină
CTA	Caz tratat anterior
CTAB	Bromura de cetrimoniu
DLM	Delamanid
DOTS	Curs scurt de terapie observată direct
DS	Deviația standard
EMB/E	Etambutol
ESX-3	Sistem de secreție specific bacterian
ETH	Etionamidă
GTM	Model General de Reversibilitate Temporală
GU	Unități de creștere (grow unit)
H/INH	Isoniazidă
HIV	Virusul imunodeficienței umane
IC	Indice de consistență
IÎC	Intervalul între cuartile
KAN	Kanamycină
L2	Linia 2 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
L4	Linia 4 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
LFX	Levofloxacină
LJ	Lowenstein-Jensen
LNZ	Linezolid
LNR	Laboratorul Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei
LSR	Laboratorul Supranațional de Referință pentru Micobacterii
MC	Mutații compensatorii
MDR	Multidrog rezistență

MFX	Moxifloxacină
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>
NaCl	Clorura de Natriu
NGS	Secvențierea de nouă generație
NTM	Micobacterii nontuberculoase
OFX	Ofloxacină
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
OR	Odds ratio // Raportul șanselor
PAS	Acid para - aminosalicilic
PGL	Propanediolul glicerolipidelor
PZA/Z	Pirazinamidă
RIF/R	Rifampicină
RR	Rezistență la rifampicină
SDS	Dodecil sulfat de sodiu
SIME-TB	Sistemul Electronic Național de Monitorizare și Evaluare a Tuberculozei
SNP	Polimorfismul unui singur nucleotid
STM	Streptomycină
TB	Tuberculoza
TCA	Ciclul tricarboxilic
TE	Tris cu EDTA tampon
TGS	Secvențierea țintită de nouă generație
TSM	Testarea sensibilității la medicamente (antituberculoase)
WGS	Secvențierea întregului genom
XDR	Rezistență extinsă la medicamente

LISTA FIGURILOR

Figura 1. Etapele secvențierii întregului genom al <i>M. tuberculosis complex</i> (53).....	22
Figura 2. Liniile filogenetice ale <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> (77).....	26
Figura 3. Selectarea tulpinilor de <i>M. tuberculosis</i> incluse în analiza filogenetică	40
Figura 4. Rata subliniilor genotipice de <i>M. tuberculosis complex</i>	41
Figura 5. Arborele filogenetic a tulpinilor MTBC M/XDR din Republica Moldova, 2013-2018	42
Figura 6. Rata liniilor de <i>M. tuberculosis complex</i> (A) și de clustere moleculare (B) pe perioada 2013-2018 (** - $p < 0,01$, $p < 0,0001$, nu indică faptul că valorile p sunt $> 0,05$).....	43
Figura 7. Transmiterea MTBC și rezistența la medicamente în Republica Moldova 2013-2018.	44
Figura 8. Rezistența genotipică a principalelor linii MTBC în funcție de anul de prelevare a probelor (nu au fost indicate valorile $p > 0,05$).....	45
Figura 9. Profilul de rezistență fenotipică și rezistență genotipică pentru tulpinile L2.....	46
Figura 10. Profilul de rezistență fenotipică și rezistență genotipică pentru tulpinile L4.....	47
Figura 11. Mutații compensatorii și transmisibilitatea în întreaga cohortă de tulpini de <i>M. tuberculosis complex</i>	49
Figura 12. Mutații compensatorii și transmisibilitate în funcție de linia MTBC	50
Figura 13. Caracteristici filogenetice ale transmisibilității și rezistenței antimicrobiene independentă de prezența mutațiilor compensatorii și de linia <i>M. tuberculosis complex</i>	501
Figura 14. Homoplazie și selecție pozitivă putativă în funcție de linia <i>M. tuberculosis complex</i>	52
Figura 15. Selectarea tulpinilor <i>M. tuberculosis</i> pentru determinarea rezistenței dobândite la bedaquilină	67
Figura 16. Concentrațiile minime inhibitorii (CMI) ale bedaquilinei ale <i>M. tuberculosis complex</i>	71
Figura 17. Asocierea dintre rezultatul negativ al tratamentului și numărul de medicamente inactive în schema terapeutică la pacienții care au primit bedaquilină ca parte a regimului de tratament a TB MDR (2016-2018).....	72
Figura 18. Selectarea tulpinilor <i>M. tuberculosis</i> izolate de la pacienții TB MDR cu expunere la linezolid.....	81
Figura 19. Rezistența geno-fenotipică a tulpinilor <i>M. tuberculosis</i> la linezolid (n=52).....	83
Figura 20. Rata tulpinilor <i>M. tuberculosis</i> rezistente la linezolid pe linii genotipice și mutații compensatorii	84
Figura 21. Distribuția concentrației minime inhibitorii (CMI) la linezolid pentru tulpinile <i>M. tuberculosis complex</i> și rezultatele secvențierii.....	84
Figura 22. Medicamente active în regimul de tratament cu linezolid	87

LISTA TABELELOR

Tabel 1. Genele <i>M. tuberculosis complex</i> de importanță majoră și mutațiile acestora asociate cu rezistența înaltă sau joasă la preparatele antituberculoase (77).....	31
Tabel 2. Homoplazia în genele implicate în rezistența la medicamente și evoluția compensatorie	53
Tabel 3. Caracteristicile clinice și rezultatele tratamentului conform liniilor genotipice ale <i>M. tuberculosis complex</i>	54
Tabel 4. Caracteristicile pacienților cu TB MDR tratați în Republica Moldova în perioada 2013-2018	55
Tabel 5. Asocieri ale parametrilor clinici și ale mutațiilor implicate în rezistența la medicamente și efectele compensatorii cu linia de <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	55
Tabel 6. Asocieri între parametrii clinici, linia genotipică a complexului <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> , mutațiile implicate în rezistența la medicamente și cele compensatorii cu rezultatele negative ale tratamentului antituberculos.	56
Tabel 7. Asocieri între parametrii clinici, linia complexului <i>Mycobacterium tuberculosis</i> și mutațiile implicate în rezistența la medicamente și efectele compensatorii cu boala cavitara în începutul tratamentului în rândul cazurilor noi	58
Tabel 8. Concentrațiile de medicamente testate	63
Tabel 9. Caracteristicile clinico-demografice ale pacienților din studiu versus cei neincluși în cercetare.....	68
Tabel 10. Rezultatele testării genotipice și fenotipice la bedaquilină și clofazimină a tulpinilor de <i>M. tuberculosis complex</i> izolate înainte și după includerea bedaquilinei în schema terapeutică la pacienții TB MDR din Republica Moldova, perioada 2016 - 2018	70
Tabel 11. Analiză univariată a factorilor asociați cu rezultatele negative ale tratamentelor pentru tuberculoza multidrog rezistentă pe bază de bedaquilină.....	73
Tabel 12. Caracteristica cohorței	82
Tabel 13. Mutațiile <i>M. tuberculosis complex</i> în genele <i>rrl</i> și <i>rplC</i> cu rezistență fenotipică la linezolid.	85
Tabel 14. Factori de risc pentru rezistența la linezolid, regresie logistică univariată.....	86
Tabel 15. Factori de risc pentru rezistența la linezolid, regresie logistică multiplă	86

INTRODUCERE

Actualitatea temei

În ultimul deceniu au fost înregistrate progrese semnificative în eficientizarea diagnosticului rapid și ameliorarea posibilităților de tratament al tuberculozei (TB). Au fost implementate la scară largă instrumente pe bază de amplificare a acizilor nucleici de tipul celor Xpert MTBC/Rif, care au redus semnificativ întârzierea terapeutică și au facilitat confirmarea paternului de multidrog rezistență (MDR) a bolii [1]. La fel, au fost implementate noi medicamente antituberculoase precum bedaquilina sau pretomanidul și repropuse pentru tratamentul antituberculos preparate antibacteriene precum linezolidul [2]. Acestea au permis reducerea duratei tratamentului și îmbunătățirea eficacității terapiei. Cu toate acestea, TB rămâne una dintre cele mai mari provocări de sănătate publică la nivel global [3]. Astfel în anul 2022 Organizația Mondială a Sănătății a estimat 10,6 milioane de îmbolnăviri noi și 1,3 milioane de decese cauzate de tuberculoză.

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) [4]. 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% [5]. 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 selecția și menținerea transiterii active a tulpinilor rezistente și extinderea endemiei de TB MDR în această regiune [3,4,6]. 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 oferi avantaje tulpinilor de *M. tuberculosis complex* cu rezistență la medicamentele antituberculoase [7].

Din perspectiva celor expuse mai sus cercetarea diversității genotipice a tulpinilor de *M. tuberculosis complex* este esențială pentru identificarea și caracterizarea tulpinilor rezistente la medicamente, precum și pentru evaluarea transiterii acestora în comunitate. Caracteristicile genotipice ale tulpinilor de *M. tuberculosis complex* condiționează sensibilitatea acestora la preparatele antituberculoase, iar identificarea acestor determinante este indispensabilă perfecționării diagnosticului molecular-genetic al acestei boli.

Studiul detaliat al genomului *M. tuberculosis complex* oferă informații esențiale privind evoluția și adaptabilitatea bacteriei, fiind deosebit de relevant în contextul utilizării medicamentelor de ultimă generație, precum bedaquilina, delamanidul și linezolidul, importante pentru tratamentul TB MDR. Apariția și răspândirea rezistenței *M. tuberculosis complex* la aceste medicamente impun studii molecular-genetice pentru identificarea mecanismelor implicate. Analiza detaliată a mutațiilor asociate rezistenței la medicamente și a profilului genomic al tulpinilor de *M. tuberculosis complex* pot oferi informații semnificative despre evoluția rezistenței și despre modul în care aceste tulpini se răspândesc în populație.

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 complex* 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 am urmărit să evaluăm 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, tratament antituberculos, 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 determinatele genotipice cu impact asupra rezistenței la antimicrobiene a *Mycobacterium tuberculosis* și evoluției clinice a tuberculozei.
4. Identificarea corespondentelor genotipice ale rezistenței micobacteriene la medicamentele cheie utilizate în tratamentul tuberculozei multidrog-rezistente.

Sinteza metodologiei de cercetare

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

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 de *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova. În special, au fost comparate determinatele 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 determinatele 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 în regimul terapeutic administrează bedaquilina.

Cel de al treilea studiu a reprezentat un studiu de cohortă în care au fost evidențiați factorii de risc de achiziționare 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 genotipice asociate cu rezistența la acest medicament la tulpinile MDR de *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova.

Sumarul compartimentelor tezei

Teza este expusă pe 129 pagini de text și include: introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia ce conține 210 titluri, două anexe, 15 tabele și 22 figuri.

În Introducere este argumentată actualitatea și necesitatea prezentei lucrării. Sunt expuse scopul și obiectivele cercetării. Este descrisă noutatea și originalitatea problemei, soluționarea metodologică, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării. Sunt aduse informații despre aprobarea și implementarea rezultatelor științifice.

În *Capitolul I*, se prezintă și se sintetizează date relevante din literatura de specialitate, privitor la liniile genotipice ale *M. tuberculosis complex*. Sunt detaliate tehnicile de analiză moleculară și testare a sensibilității fenotipice și genotipice. Se descriu 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*.

În *Capitolul II*, sunt descrise metodologia și rezultatele cercetării dedicate reconstrucției filogenetice a tulpinilor MDR ale *M. tuberculosis complex* din Republica Moldova. Se descrie evoluția temporală a acestora. Se analizează rolul mutațiilor homoplazice și a celor compensatorii și rolul putativ în evoluția liniilor genotipice ale tulpinilor *M. tuberculosis complex* prezente în Republica Moldova. La fel, sunt descrise asocierile dintre liniile genotipice ale *M. tuberculosis complex* și leziunile cavitare precum și rezultatul negativ al tratamentului antituberculos la bolnavii TB MDR.

În *Capitolul III* sunt descrise metodologia și rezultatele cercetării dedicate analizei achiziționării rezistenței la bedaquilină în primii doi ani de la introducerea acestui medicament în schemele de tratament TB MDR în Republica Moldova. Sunt raportate, frecvența fenomenului, spectrul mutațiilor asociate cu rezistența la bedaquilină și factorii micobacterieni asociați cu eșecul terapiei la bolnavii care au administrat acest medicament ca și parte a tratamenului pentru TB MDR.

În *Capitolul IV* sunt descrise metodologia și rezultatele cercetării dedicate analizei dobândirii rezistenței la linezolid la bolnavii cu TB MDR în Republica Moldova. Similar capitolului

precedent sunt descrise, frecvența fenomenului, spectrul mutațiilor asociate cu rezistența precum și factorii de risc asociați, cât și riscul de apariție a rezistenței față de acest medicament.

Concluzii generale și recomandări. Acest compartiment conține șase concluzii generale și patru recomandări care răspund la ipotezele de cercetare incluse în obiectivele lucrării.

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 contribuit la soluționarea unei probleme științifice, aplicative importante.

- 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 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. 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 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*. 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 ftiziopneumologie "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 tezei au fost prezentate la 12 foruri și evenimente științifice.

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

1.1 Povara epidemiologică asociată infecției cu *Mycobacterium tuberculosis complex*

Tuberculoza (TB) a fost în mod constant o cauză majoră de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. Conform datelor OMS în anul 2022, la nivel mondial incidența estimată a tuberculozei a constituit circa 10,6 milioane cazuri, ceea ce corespunde la 133 cazuri la 100.000 populație. În același timp 27% dintre aceste cazuri rămân în continuare nediate diagnosticate [11]. La ora actuală tuberculoza ocupă locul doi în topul cauzelor de deces determinat de un singur agent infecțios (întâietatea fiind deținută de SARS-Cov2), epidemia fiind susținută de transmiterea continuă a infecției în comunitate.

În prezent, provocarea majoră în controlul tuberculozei este dată de necesitatea asigurării la scară largă a diagnosticului prompt și oferirea tratamentului eficient în cazurile de boală provocate de tulpinile multidrog-rezistente (MDR) de *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC).

Rata cazurilor de tuberculoză cu rezistență la cel puțin un medicament antituberculos la nivel global constituie 11%, incluzând și cazurile de TB MDR cărora le revine circa 5% din numărul total de cazuri de tuberculoză [12].

Tuberculoza rezistentă la medicamente, inclusiv formele multidrog-rezistente (MDR) și cu rezistență extinsă (XDR), sunt endemice în țările din Europa de Est și Asia Centrală. În aceste regiuni prevalența MDR în rândul pacienților cu TB nou diagnosticați ajunge la 30%, în timp ce în rândul cazurilor de retratament depășește 50% [13,14]. Întreruperile în aprovizionarea cu medicamente și administrarea inadecvată a regimurilor de tratament se numără printre factorii care au favorizat selecția clonelor de TB MDR în aceste zone geografice în perioada anilor '90 a secolului XX. În același timp, controlul deficitar al infecției în comunitate împreună cu întârzierile în diagnosticare și tratament contribuie la transmiterea activă a tulpinilor rezistente și la extinderea epidemiei de TB MDR la ora actuală [7,15]. Cu toate acestea, ar putea fi ca unele caracteristici genetice ale MTBC să contribuie la selecția și transmiterea micobacteriilor rezistente la medicamente în aceste regiuni. Datele din unele zone geografice (altele decât Europa de Est și Asia Centrală) arată că astfel de trăsături genetice precum mutațiile compensatorii sau homoplazia, ar putea conferi avantaje tulpinilor de MTBC în sensul perpetuării rezistenței la medicamente [16].

La ora actuală Republica Moldova înfruntă o importantă endemie de tuberculoză MDR [8,17]. La nivel mondial, Republica Moldova se află printre țările cu cele mai înalte rate ale tuberculozei MDR acestea constituind 28% printre cazurile noi și 58% printre cazurile de retratament. Din aceste considerente țara noastră a fost inclusă în lista OMS a țărilor cu prioritate

înalță în răspunsul la tuberculoza MDR. Depășirea provocărilor date de tuberculoza MDR în Republica Moldova depinde în mare măsură de accesul la medicamentele antituberculoase și la metodele de diagnostic rapid al acestei boli [18–20].

1.2 Identificarea și aprecierea sensibilității față de medicamentele antituberculoase a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis complex*

Diagnosticul tuberculozei presupune identificarea în specișenele biologice colectate de la persoana suspectă de tuberculoză a micobacteriilor ce aparțin MTBC [21]. Materialul colectat poate fi supus examinării atât prin testele clasice precum microscopia sau cultura, cât și prin metode biomoleculare rapide (metode molecular-genetice/metode moleculare). Diagnosticul tuberculozei implică și testarea consecutivă a sensibilității MTBC la medicamentele antituberculoase, pentru care standard de referință rămâne a fi metodele pe bază de cultură (metode fenotipice). Cu toate acestea tendința generală în acest domeniu este de substituire în viitorul previzibil a metodelor fenotipice de testare a sensibilității cu cele pe bază de tehnici molecular-genetice (metode genotipice) [22].

Examinarea microscopică

Examenul microscopic pentru identificarea MTBC a fost propus mai mult de 100 de ani în urmă. Microscopia rămâne a fi o metodă simplă, rapidă, ușor de reprodus și ieftină, dar cu o sensibilitate redusă (25-82%). Pragul de detectare a MTBC prin microscopie fiind de 5000-10000 germeni/ml produs. Microscopia nu poate oferi informații despre viabilitatea germenilor și sensibilitatea față de medicamentele antituberculoase [23,24]. Acuratețea diagnostică a microscopiei este deosebit de redusă la persoanele cu HIV, la copii și în cazul specișenelor extrapulmonare.

Particularitățile moleculare ale peretelui celular al micobacteriilor fac posibilă vizualizarea acestor microorganisme la microscopia optică doar după colorarea prin tehnici speciale, Zhiel-Neelsen sau Kinyoun [25]. O alternativă cu sensibilitate mai mare o reprezintă colorațiile fluorescente cu auramină [26,27].

Metode de izolare și testare a sensibilității pe bază de cultură

Cultivarea MTBC reprezintă metoda de referință în diagnosticul bacteriologic al tuberculozei. Datorită sensibilității, cultivarea permite confirmarea etiologiei cât și testarea sensibilității la medicamentele antituberculoase. Cultura are o limită de detecție 10-100 bacili/ml produs, dar în același timp, este o metodă laborioasă și complexă care nu poate fi corect efectuată decât în laboratoare specializate [28,29].

Cultivarea MTBC poate fi efectuată atât pe medii de creștere solide (Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H11), cât și lichide (Middlebrook 7H9). Dintre mediile solide pe bază de ou sau agar cel mai frecvent utilizat este mediul Löwenstein-Jensen. Pentru cultivarea pe medii lichide cel mai frecvent sunt utilizate tuburile MGIT - *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT), care conțin mediu pe bază de bulion Middlebrook 7H9 [30]. Pe lângă mediul de creștere tuburile mai conțin un amestec de antibiotice (PANTA) cu scop de a inhiba creșterea altor bacterii și a fungilor. La baza tubului se află un indicator fluorescent, impregnat într-o membrană de silicon, care devine pozitiv în condiții de hipoxemie, secundar creșterii micobacteriilor. Tuburile MGIT sunt incubate în mod automatizat în dispozitive de tipul celor BACTEC MGIT 960. Rezultatul culturilor pe mediu lichid este obținut semnificativ mai repede (în medie 12 zile) comparativ cu culturile pe mediu solid (în medie 25 zile) [31]. Cu toate acestea, pentru a spori acuratețea diagnostică este recomandată cultivarea în paralel atât pe medii lichide, cât și solide. Identificarea micobacteriilor în culturile pozitive poate fi făcută prin metode moleculare (în acest caz pot fi identificate inclusiv micobacteriile nontuberculoase) sau prin teste imuno-cromatografice rapide bazate pe detectarea antigenilor micobacterieni [28].

Testarea fenotipică a sensibilității MTBC la medicamentele antituberculoase poate fi efectuată atât pe medii solide, cât și pe cele lichide [25]. Rezultatele testării rezistenței la medicamente pot fi influențate de mai mulți factori, care depind de natura și proprietățile agentului patogen, metoda aplicată, tipul de rezistență (fenotipică sau genotipică) [32,33].

În cazul mediilor solide de regulă este utilizată una dintre metodele indirecte de testare a sensibilității - metoda proporțiilor, metoda raportului de rezistență sau metoda concentrațiilor absolute. Aceste metode sunt standardizate în mare parte doar pentru medicamentele antituberculoase de linia întâi (rifampicina, izoniazida, etambutolul și pirazinamida), iar rezultatele sunt obținute după o perioadă de până la 8 săptămâni [34]. Cel mai des utilizată pentru testarea sensibilității MTBC, inclusiv în Republica Moldova, este metoda indirectă a concentrațiilor absolute. Neajunsul principal al acestei metode constă în caracterul laborios și timpul îndelungat de obținere a rezultatelor [28].

Metoda de referință pentru testarea fenotipică a rezistenței la medicamente este considerată cultura lichidă în tuburi MGIT. Această tehnică este validată pentru majoritatea medicamentelor antituberculoase și oferă rezultatele privitor la sensibilitate peste două săptămâni de la inoculare. De regulă, pentru incubarea tuburilor MGIT sunt utilizate sistemele BACTEC MGIT 960 cu aplicarea concentrațiilor critice a medicamentelor testate (CCM) [35]. Concentrația critică se definește ca acea concentrație minimă a medicamentului care *in vitro* inhibă creșterea a 99% dintre tulpinile sălbatice de MTBC. Pentru fiecare dintre medicamentele antituberculoase sunt definite

CCM standard, care sunt periodic revizuite [36]. Pentru interpretarea testelor de sensibilitate pe baza echipamentului BACTEC MGIT 960 a fost dezvoltată programa computerizată TBExiST care permite monitorizarea continuă a creșterii și o analiză mai detaliată a rezultatelor obținute [37].

Teste molecular-genetice pe baza reacției de polimerizare în lanț (PCR) aplicate în identificare a *M. tuberculosis complex* și apreciere a rezistenței la medicamente

Testele GeneXpert

Testele de diagnosticare a tuberculozei s-au îmbunătățit substanțial în ultimii ani. La ora actuală OMS recomandă utilizarea a două tipuri de teste în calitate de teste de primă intenție la majoritatea persoanele cu simptome sugestive pentru tuberculoză - GeneXpert (Xpert) și Truenat (utilizat cu precădere în India) [24].

Instrumentele GeneXpert MTBC/Rif și GeneXpert MTBC/Rif Ultra au devenit cele mai importante instrumente pentru diagnosticul rapid al tuberculozei, în special în contextul gestionării formelor de tuberculoză rezistente la medicamente. Tehnica GeneXpert, dezvoltată de Cepheid, este o metodă moleculară utilizată pentru detectarea MTBC și identificarea rezistenței la rifampicină. Această tehnologie utilizează tehnica PCR în timp real pentru a amplifica și detecta specific secvențe de ADN asociate cu MTBC. Testul s-a impus prin rapiditate (cca 2 ore din momentul inițierii prelucrării probei în laborator), simplitatea efectuării și automatizarea completă, ceea ce face posibilă implementarea inclusiv în laboratoare cu dotări minimale cu un personal cu instruire elementară. Unele diferențe tehnice fac ca Xpert MTBC/Rif Ultra să se bucure de o sensibilitate mai mare (plus 10-15%) comparativ cu Xpert MTBC/Rif, dar cu pierderea a 2-3% din specificitatea testului. De curând a fost anunțat și implementat în practică GeneXpert XDR TB care permite testarea rezistenței la izoniazidă, fluoroquinolone aminoglicozidele injectabile și etionamidă [38,39].

Testele de hibridizare liniară (Line Probe Assay - LPA)

Tehnicile LPA se bazează pe tehnologia de amplificarea și hibridizare a fragmentelor ADN de interes pe bandetele de nitroceluloză ceea ce permite identificarea moleculară a MTBC și aprecierea sensibilității la unele medicamente antituberculoase.

Pentru efectuarea testului este necesară izolarea prealabilă a ADN-ului și amplificarea secvențelor de interes. Secvențele ADN amplificate sunt hibridizate cu sonde oligonucleotidice specifice complementare. Reacția de hibridizare este realizată pe bandetele de nitroceluloză, pe care produsul de hibridizare poate fi citit vizual sub formă de benzi monocrome fiecare dintre care corespunde unei secvențe de amplificare [40]. Astfel, LPA permite detectarea simultană a mai

multor mutații de interes într-un număr mare de probe. Timpul de efectuare a testelor LPA variază între 24-48 ore. LPA poate fi efectuat pe probele de spută nativă cu microscopie BAAR pozitivă sau pe izolatele din cultură. OMS a aprobat pentru utilizare unele dintre variantele comerciale de LPA existente la moment. Două dintre acestea permit de a detecta MTBC și apreciază sensibilitatea față de izoniazidă și rifampicină (GenoType MTBDRplus ver. 1 și 2 (Hain Lifescience/Bruker, Germany), Genoscolar NTM+MDRTB kit 2 (Nipro, Japan)). Un alt test LPA aprobat de OMS oferă aprecierea sensibilității față de fluorochinolone și aminoglicozide (GenoType MTBDRsl ver. 1 și 2 (Hain Lifescience/Bruker, Germany)) [41]. Acuratețea diagnostică a acestor trei teste în specișenele cu microscopie BAAR pozitivă este similară atât pentru aprecierea sensibilității față de izoniazidă (sensibilitatea 90% și specificitatea 99%), cât și față de rifampicină (sensibilitatea 97% și specificitatea 98%) [42]. În cazul fluorochinolonei și aminoglicozidelor sensibilitatea oferită de LPA variază între 80-97%, iar specificitatea atinge 100% [43,44].

Sistemele de diagnostic molecular genetic de înaltă capacitate

Sistemele de diagnostic molecular genetic de înaltă capacitate, cum ar fi Fluorotype MTBDR de la Hain Lifescience și BD MAX-TB, sunt utilizate pentru identificarea și testarea sensibilității *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) la medicamentele izoniazidă și rifampicină. Aceste sisteme folosesc tehnici moleculare pentru a detecta ADN-ul bacteriei și pentru a evalua modificările genetice care pot conferi rezistență la aceste medicamente [45].

Fluorotype MTBDR este un test PCR multiplex fluorescent efectuat într-un singur tub. Testul poate determina sensibilitatea la izoniazidă și rifampicină a tulpinilor de MTBC direct din probele native. Sistemul este semiautomat, concomitent fiind analizate 96 de probe. Rezultatele sunt obținute peste 3 ore de la inițierea testului, interpretarea fiind la fel automatizată [46].

BD MAX MDR-TB un test pe bază de PCR real-time multiplex. Testul este complet automatizat, analizând concomitent 24 de probe, rezultatul este obținut peste patru ore de la inițierea procesării [47].

Teste molecular-genetice pe bază de secvențiere a genomului micobacterian aplicate în genotiparea și aprecierea rezistenței la medicamente a *Mycobacterium tuberculosis complex*

Secvențierea de nouă generație (Next Generation Sequencing - NGS)

Secvențierea de nouă generație este o metodă care poate oferi cele mai detaliate informații privitor la profilul de rezistență genotipică al MTBC. Avantajul major al NGS față de metodele pe bază de cultură este rapiditatea obținerii rezultatelor, iar față de testele molecular-genetice pe bază de PCR - detectarea nu doar a mutațiilor incluse în test, dar caracterizarea completă și detaliată a

întregului genom (în cazul tehnicii de Whole Genome Sequencing - WGS) sau a fragmentelor genomice de interes (în cazul la Targeted NGS - TGS) [48].

Efectuarea NGS include următoarele etape (Figura 1): 1) extragerea ADN (există o varietate de kituri comerciale pentru extragerea ADN-ului purificat cu greutate moleculară mare); 2) pregătirea bibliotecii de ADN - presupune fragmentarea chimică a ADN-ului genomic până la molecule scurte (100-500 pb), ulterior la capetele contondente ale fragmentelor obținute sunt fixate oligonucleotide specifice numite adaptoare care sunt amplificate prin PCR; 3) efectuarea automatizată a NGS; 4) citirea și interpretarea datelor care necesită aplicare de programe specializate disponibile fie în acces liber (PhyReSE, TB Profiler, Mykrobe, etc.) fie ca versiuni comerciale [49–51].

În procesul de analiză a datelor obținute prin NGS are loc compararea secvențelor nucleotidice a tulpinii studiate cu cele din cataloagele de referință și identificarea polimorfismelor în genele determinate a rezistenței. Unul dintre aceste cataloage - ReSeqTB - este elaborat și menținut de către OMS, dar există și alte baze de date manageriate de instituții de cercetare sau consorții internaționale [52].

Capacitatea NGS de a determina rezistența tulpinilor micobacteriene nu este aceeași pentru toate medicamentele antituberculoase. Aceasta depinde de cunoașterea genelor responsabile de rezistența față de medicamentul respectiv. Astfel, aprecierea rezistenței față de rifampicină, izoniazidă, fluorochinolone, aminoglicozide, etambutol și pirazinamidă la ora actuală se face cu o acuratețe înaltă, în timp ce diagnosticul rezistenței față de bedaquilină sau linezolid încă necesită perfecționare [53,54].

Tendențele în domeniul de implementare în practica curentă a NGS (pentru testarea sensibilității la medicamente) sunt orientate spre dezvoltarea unor instrumente diagnostice, mai curând pe baza de TGS, care ar permite de a efectua într-un singur ciclu toate etapele secvențierii direct din speciimenele native, fără izolarea prealabilă a tulpinii de MTBC. Diagnosticul nemijlocit din speciimenele native este o provocare importantă a tehnicilor de secvențiere, aceasta datorită conținutului important în probele clinice (> 99%) a ADN-ului nonmicobacterian (uman sau al altor microorganisme) [55].

De curând au fost raportate date promițătoare privitor la utilizarea clinică a unor instrumente diagnostice pe bază de NGS pentru testarea sensibilității MTBC din probele native de spută. În special este vorba de Deeplex Myc-TB (Genoscreen, Lille, France) [56] și DeepCheck-TB (Translational Genomics Research Institute, Flagstaff, USA). La fel, sunt în proces de elaborare instrumente care să corespundă criteriilor de "test aplicabil la patul pacientului" cu utilizarea

platformelor de secvențiere MinION (Oxford Nanopore, Oxford, UK) sau iSeq Illumina (San Diego, USA) [57,58].

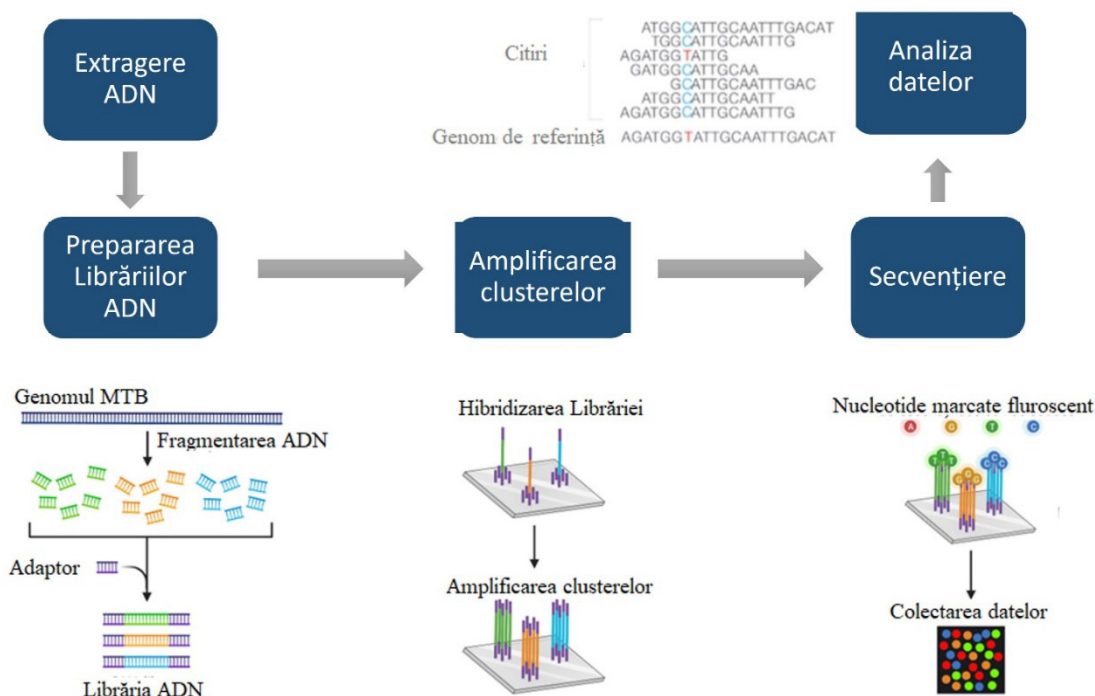


Figura 1. Etapele secvențierii întregului genom al *M. tuberculosis complex* [59]

NGS a fost cu succes aplicată în studiile naționale de supraveghere a rezistenței în mai multe regiuni ale lumii, iar în unele țări cu incidență joasă a tuberculozei deja a substituit în totalitate testele fenotipice de apreciere a sensibilității față de medicamentele antituberculoase de linia întâi [60,61]. Astfel, în viitorul previzibil este foarte probabilă implementarea pe scară largă la nivel global a NGS pentru aprecierea în mod curent a sensibilității față de toate medicamentele antituberculoase.

Tehnicile de secvențiere a genomului micobacterian (în special WGS) pot fi utilizate nu doar în scopul diagnosticului tuberculozei și aprecierii profilului de rezistență, dar și pentru genotiparea MTBC. Analiza datelor de genotipare pot fi aplicate pentru investigarea epidemiologică a focarului de boală, elaborarea medicamentelor și vaccinurilor precum și în înțelegerea evoluției și patogeniei MTBC [62]. Altfel spus, analiza datelor de secvențiere permite identificarea sursei de infecție și a căilor de transmitere, înțelegerea evoluției temporo-spațiale a MTBC și a dezvoltării rezistenței la medicamentele antituberculoase [62–64].

Genotiparea speciei se face în special în baza analizei unor regiuni țintă (gene țintă). Una dintre aceste regiuni țintă corespund genelor codificatoare a componentelor necesare pentru sinteza ARNr 16S, care intră în structura subunității mici ribozomale RNP 30S. Alte regiuni țintă

sunt date de genele house-keeping esențiale pentru sinteza proteinelor care participă în cele mai importante procese moleculare cum este transcripția sau replicarea MTBC, fiind cazul genelor *rpoB*, *gyrB*, *hsp65*, *secA*. De asemenea pot fi analizate regiunile "spacer" din genele pentru sinteza ARNr 16S-23S rRNA. Unul din avantajele secvențierii genei *rpoB*, este posibilitatea de a diferenția dintre microorganismele MBTC, cât și NTM, precum și de a identifica mutațiile ce conferă rezistență la rifampicină [65,66].

De menționat că genotiparea MTBC în scopul analizei epidemiologice sau filogenetice ar putea fi efectuată și prin alte metode decât secvențierea.

1.3 Metode nonsecvențiale de genotipare a *Mycobacterium tuberculosis* complex

Metodele de genotipare pot fi clasificate în metode bazate pe secvențiere precum este WGS/NGS și metode nonsecvențiale care se pot împărți în două categorii: 1) neamplificate (pe bază de gel) așa ca gel electroforeza în câmp pulsatoriu (PFGE) și RFLP și 2) metodele de amplificare (bazate pe PCR), acestea sunt spoligotiparea, MIRU-VNTR, RAPD-PCR, PCR bazat pe secvențe repetitive (REP- PCR)[67].

Spoligotiparea

Spoligotiparea se bazează pe evaluarea polimorfismelor regiunii conservate CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) din genomul bacterian. Tehnica implică amplificarea prin PCR a regiunii DR (Direct Repeat - 36 pb), care în cazul micobacteriilor tuberculoase cuprinde 43 de regiuni "spacer" cu poziție înalt conservată și lungime de 35-41 pb [68]. Ordinea "spacerilor" poate fi urmărită la descendenții filogenetici ai tulpinii index. În prezent, au fost identificate 94 de secvențe „spacer” diferite, dintre care 43 sunt utilizate în spoligotiparea tulpinilor MTBC. După amplificare, produsele PCR denaturate se aplică în ordine inversată pe o membrană pe care sunt încorporate oligonucleotide "spacer" sintetice legate covalent, deduse din secvențele regiunii DR ale celor două tulpini de referință (*M. tuberculosis* complex H37Rv și *M. bovis* BCG P3). Caracterizarea tulpinii (spoligotipului) se bazează pe prezența sau absența "spacerilor", fiind obținut un profil tradus într-un cod binar (0 = absent, 1 = prezent) [69–71].

Tehnica MIRU-VNTR

Aproape toate genomurile eucariotelor superioare posedă secvențe repetate în tandem, care sunt dispersate în mii de copii în genom. Frecvența de repetare a acestor loci este foarte variabilă, astfel că aceste secvențe sunt numite loci cu număr variabil de repetiții în tandem (VNTR – variable number tandem repeats) [72].

În 1997, Supply et al., au identificat în genomul MTBC o nouă structură asemănătoare minisateliților, compusă din secvențe repetitive de la 50 până la 150 pb și le-au denumit „unități

repetitive micobacteriene intercalate” (MIRU - Mycobacterial Interspersed Repetitive Units). Acestea sunt răspândite în 41 de locații de-a lungul genomului *M. tuberculosis complex* H37Rv (genom de referință). Aplicarea PCR pentru 12 dintre acești loci variabili repetați în tandem urmate de electroforeza în gel, reprezintă principiul genotipării *MIRU-VNTR*. [73]. *MIRU-VNTR* are o putere discriminatorie mai mare decât spoligotiparea, iar folosirea lor combinată crește acuratețea studiilor epidemiologice cu aplicare acestor tehnici [74–76].

Tehnica IS6110 RFLP

Genotiparea RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) detectează variațiile generate de elementul de inserție IS6110 din genomul micobacterian. Elementele de inserție sunt capabile să-și facă copii și apoi să-și insereze copia oriunde în genom, proces cunoscut sub numele de transpoziție. Tulpinile pot fi diferite, atât după numărul de copii ale IS6110, cât și după poziția IS6110 în ADN-ul bacterian [77].

Secvența IS6110 aparține familiei IS3 (secvența de inserție 3) și are o lungime de 1355 pb cu repetiții terminale inversate unice de 28 pb (TIR - Inverted Tandem Repeats). Regiunea dintre aceste repetări include două cadre de citire suprapuse, *orfA* și *orfB*, care codifică pentru o transpozază (enzimă responsabilă de transpunerea secvenței de inserție) [78]. IS6110 se găsește exclusiv în MTBC [79]. La majoritatea membrilor complexului secvența este prezentă în mai multe copii, deși *M. bovis* conține, în mod normal, doar o singură copie. În general, numărul de copii ale IS6110 variază de la 0 la 25 și depinde de frecvența transpoziției, care este condiționată de natura regiunii genomice unde are loc transpoziția. Deși, IS6110 poate fi integrat în orice loc de pe cromozom, există regiuni cu frecvență mai mare de transpoziție - așa-numitele puncte fierbinți de integrare. Ele sunt localizate, de obicei, în regiunile codificatoare ale ADN-ului MTBC [78].

1.3 Liniile filogenetice ale *Mycobacterium tuberculosis complex* - particularități epidemiologice și caracteristici clinice

Tuberculoza este cauzată de tulpini micobacteriene ce aparțin *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC). Sunt descrise cel puțin șapte linii filogenetice de MTBC adaptate la specia umană (în ultima perioadă este discutată și cea de a opta), fiecare dintre care are caracteristici distincte în ceea ce privește evoluția, transmisibilitatea, rezistența la medicamente, interacțiunea cu gazda și latența [80].

Liniile filogenetice de MTBC patogene la om și la animale își au originea de la un progenitor comun de pe continentul african (Figura 2) însă, evenimentele moleculare care au însoțit această apariție rămân în mare parte necunoscute [81]. Frecvența și distribuția liniilor de MTBC sunt

influențate de mediu, în același timp, depinzând de factori sociali, economici și ecologici [82]. Liniile MTBC au co-evoluat de-a lungul mileniilor și diferă în ceea ce privește distribuția geografică și asocierea cu subpopulațiile umane. Diseminarea temporo-spațială a tulpinilor de MTBC a fost puternic influențată de migrația speciei umane precum și de caracteristicile genetice ale celei din urmă [83]. Liniile MTBC adaptate la om sunt caracterizate de o distribuție geografică diferențiată, unele linii "generaliste", precum linia L2 și L4, sunt prezente în majoritatea regiunilor geografice, iar altele "specializate" (L5, L6 și L7) au o distribuție geografică limitată [84,85]. Astfel, cele mai răspândite sunt liniile L2 și L4, aceasta probabil, secundar unei virulențe mai mari sau/și a unui răspuns imun proinflamator întârziat sau redus din partea gazdei, ceea ce se exprimă într-o severitate mai mare a bolii și transmitere mai mare [86].

În cadrul fiecărei dintre liniile filogenetice ale MTBC sunt descrise mai multe sublinii genotipice. Acestea din urmă prezintă diferențe fenotipice, inclusiv în ceea ce ține de capacitatea lor de a cauza boala [87]. Deși, corelația nemijlocită dintre sub-liniile genotipice și caracteristicile clinice ale bolii nu este pe deplin documentată, există încercări de a descrie diverse fenotipuri ale bolii determinate de caracteristicile genotipice ale unor tulpini micobacterine. Aceste corelații sunt influențate și de efectul de interacțiune cu alți factori precum cei de mediu sau cei imunologici [88].

Studiile imunologice au sugerat că unele tulpini precum și linii genotipice de MTBC sunt mai virulente și/sau mai infecțioase decât altele deși la ora actuală nu există determinante genetice bine stabilite care să fie recunoscute ca fiind puternic asociate cu fenotipul bolii [89]. În acest context este unanim acceptat că diferențele în ceea ce privește patogenitatea și rata de transmitere diferite sunt influențate inclusiv de genotipul gazdei și locația geografică [90]. Diferite linii filogenetice ar putea fi adaptate la anumite populații umane această idee este susținută de studii care arată că complexul gazdă - agent patogen în tuberculoza umană rămâne stabil în timp, chiar și în regiunile aglomerate în care populațiile gazdă și patogene se amestecă [85].

Tulpinile "ancestrale" de MTBC de linia 1 (L1, East African - Indian) reprezintă o cauză importantă a tuberculozei (TB) în țările din jurul Oceanului Indian. La ora actuală, patobiologia tulpinilor L1 este insuficient caracterizată. Rezultatele unui studiu recent relevă prezența a opt sublinii majore ale L1.

În cadrul acestui studiu a fost corelată structura L1 cu capacitatea de sinteză a glicolipidelor fenolice (PGL) - factori de virulență cunoscuți ai MTBC derivați din polichetide, fiind observate asocieri specifice dintre mutații în genele de biosinteză a PGL (pks15/1 sau glicoziltransferazele Rv2962c și/sau Rv2958) cu diferențele în structura populației de tulpini L1 [92,93].

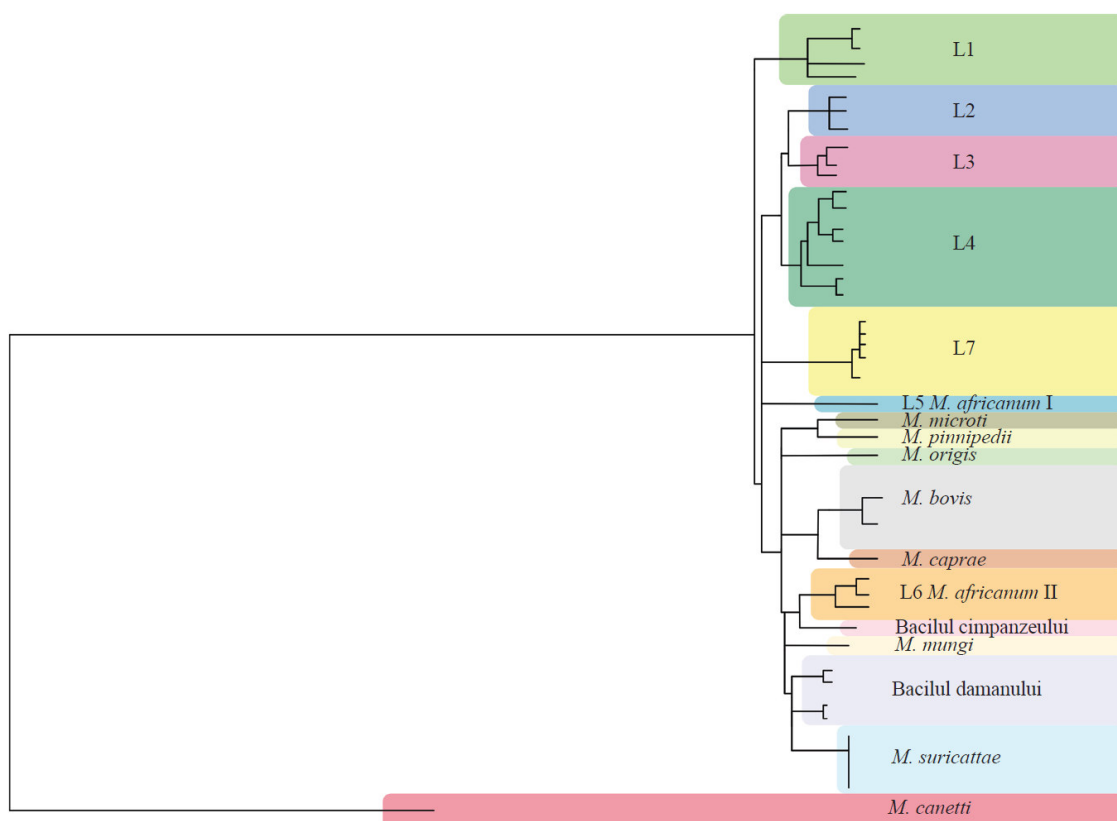


Figura 2. Liniile filogenetice ale *Mycobacterium tuberculosis complex* [91]

Tulpinile de *Mycobacterium tuberculosis* din linia L2 sunt omniprezente din punct de vedere geografic, dar cu o anumită predilecție pentru Asia, unde atât prevalența TB, cât și numărul cazurilor de TB rezistentă la medicamente sunt dintre cele mai ridicate [94]. Linia 2 este probabil originară din Asia de Est și s-a extins relativ recent în mai multe părți ale lumii [95]. Linia 2, care include subliniile de tulpini Beijing, a fost asociată în mod repetat cu rezistența la medicamente [85].

În timp ce linia 2 și linia 4 au cucerit practic întreaga lume, linia 3 are succes în special în Africa de Nord și de Est, precum și în Asia de Sud, originea evolutivă presupusă a acestor tulpini. Linia L3 poate fi de tip ancestral sau modern (Central Asia CAS/Delhi) aceasta din urmă este mai virulentă și se deosebește genetic prin deleția TbD1, fiind asociată cu epidemii și transmitere mai înaltă. Din punct de vedere metabolic are un nivel crescut de proteine implicate în metabolismul lipidelor și cantități ridicate de proteine implicate în secreția ESX-3, ciclul TCA și alte căi metabolice. Această linie are și o capacitate de supraviețuire și adaptare sporită precum și o rată de transmitere mai mare în comparație cu L1, L5, L6 și L7 [96].

Din punct de vedere al distribuției geografice, linia 4 este cea mai răspândită, deși motivele succesului răspândirii globale rămâne a fi necunoscut [85]. Se consideră că exportul repetat din zona europeană a fost principala forță motrice pentru expansiunea globală a L4, aceasta având o

răspândire considerabilă inclusiv în Africa și în America, după colonizarea de către europeni a acestor teritorii în secolele XVII-XIX [97]. Studiile de epidemiologie moleculară au demonstrat variații considerabile în ceea ce privește succesul transmiterii a diverselor tulpini din linia 4. Aceste observații sugerează că linia 4 este caracterizată de o diversitate genotipică și fenotipică care ar putea determina distribuția diferitelor subtipuri din linia 4 în diferite părți ale lumii [85]. Un alt studiu a arătat că linia 4 cuprinde sublinii distribuite la nivel global ("generale") și sublinii restrânse din punct de vedere geografic ("specifice"), sugerând o distincție între cele generale și specifice. Analizele genomice populaționale au arătat că în timp ce majoritatea epitopilor celulelor T umane au fost conservate în toate subliniile, proporția de epitopi variabili a fost mai mare în subliniile generale. Aceasta denotă că succesul global al liniei 4 reflectă strategii distincte de adaptare pentru diferite sublinii cât și confirmă influența migrației umane [85]. Diversitatea epitopilor limfocitelor T poate împiedica recunoașterea MTBC de către sistemul imun [83,98]. Apariția TB MDR cauzată de MTBC de linia 4 este în mare măsură un fenomen local, în sensul că MTBC din această linie dezvoltă în mod repetat clone rezistente în diverse regiuni ale lumii, în timp ce migrația tulpinilor rezistente pare să fi jucat un rol limitat în apariția rezistenței [99]. Liniile L5 și L6 au o răspândire foarte limitată în Africa de Vest [100].

Tulpinile de MTBC de linia L7 au fost recent identificate printre tulpinile originare din Etiopia. Tulpinile din linia 7 sunt mai puțin transmisibile în comparație cu alte tulpini de MTBC moderne [101].

Linia L8 este aparent limitată la regiunea Marilor Lacuri din Africa. În comparație cu genomul altor linii, separarea L8 a precedat pierderea regiunii genomului *cobF* - implicată în sinteza cobalaminei/vitaminei B12 – ceea ce a dus la lipsa strămoșului comun, regăsit la toate celelalte linii cunoscute de MTBC. Acest fapt susține și mai mult o origine est-africană pentru MTBC L8 și oferă markeri moleculari suplimentari privitor la lipsa genomului ancestral asociat cu adaptarea la un stil de viață patogen [102].

O caracterizare detaliată a genotipurilor MTBC servește pentru o monitorizare și o raportare mai eficientă a transmiterii bacteriene, precum și pentru îmbunătățirea înțelegerii asociațiilor genotip-fenotip precum severitatea bolii și rezistența la medicamente [94]. Studiile sugerează că diversitatea speciilor și interacțiunea lor cu organismul gazdă afectează fiziopatologia și evoluția naturală a tuberculozei. Astfel, L4 este mai probabil asociată cu TB pulmonară, în timp ce L2 și L3 se asociază cu forme de TB extrapulmonară, cum ar fi meningita TB și TB ganglionilor limfatici cervicali. Un alt studiu comparativ a arătat că tulpinile L3 și L4 au o asociere negativă cu boala extratoracică, spre deosebire de tulpinile L2 [103].

Recent a fost raportat că deleția regiunii genomice TbD1 în liniile moderne de MTBC (L2, L3 și L4), este un factor cheie al răspândirii lor epidemice la nivel global. Această pierdere determină o rezistență sporită la hipoxie, stres oxidativ și virulență sporită al acestor tulpini în comparație cu tulpinile L1 și L7. De asemenea, unele SNP (polimorfisme de un singur nucleotid) în gena *esxW* și deleția în gena *ppe38* au fost asociate cu o transmisibilitate crescută și hipervirulență a liniei Beijing (L 2.2). Dimpotrivă, mutațiile din gena *phoR* prezente la linia L6 a *M. africanum* au fost asociate cu o virulență sau o transmisibilitate mai scăzută [92].

Metodologia unanim acceptată pentru înțelegerea evoluției MTBC și a varietății genetice a tulpinilor de MBTC este analiza filogenetică [104]. Filogenetica moleculară și metodele de studiu a dinamicii evolutive permit înțelegerea legăturilor dintre diversitatea genetică și apariția rezistenței la medicamente în tulpinile de micobacterii [105]. Genele rezistente la antibiotice sunt markeri importanți pentru delimitarea evoluției și răspândirii fenomenului de rezistență [106].

Un instrument indispensabil, pentru a documenta în mod fiabil liniile filogenetice ale MTBC precum și pentru a examina relația acestora cu caracteristicile demografice ale pacienților și dezvoltarea rezistenței la medicamente, este secvențierea întregului genom (WGS – whole genome sequencing) [80]. Posibilitatea secvențierii genomurilor micobacteriene provenite din diferite zone geografice ne permite să înțelegem nu doar diversitatea genetică a MTBC, dar ne oferă posibilitatea asocierii datelor epidemiologice cu patogeneză și caracteristicile clinice ale bolii [94]. Înțelegerea diversității genotipice a MTBC poate facilita elucidarea unor caracteristici ale bolii tuberculoase precum gravitatea acesteia, starea de latență sau adaptabilitatea biologică precum și rezistența la medicamentele antituberculoase [92].

Un interes special ar putea să-l prezinte studierea metilomului MTBC, mai puțin cunoscut la ora actuală. Acesta poate fi implicat în virulență, supraviețuirea în condiții de hipoxie și apariția rezistenței la medicamente. Cunoașterea metilomilor specifici pentru fiecare linie genetică oferă posibilitatea înțelegerii mecanismelor biologice care stau la baza fenotipurilor MTBC și ale epigenomului [107].

Endemia de tuberculoză MDR din Republica Moldova este asociată cu transmiterea locală a mai multor genotipuri de MTBC cu profiluri diferite de rezistență la medicamente și distribuție geografică. Cu toate acestea majoritatea covârșitoare a tulpinilor MTBC circulante în Republica Moldova aparțin în proporție practic egală liniilor L2 și L4 [10,108]. Paleta filogenetică a liniilor de MTBC, ce se atestă în Republica Moldova mai probabil este rezultatul suprapunerii mai multor valuri epidemice de TB MDR dintre care unele s-au extins în întreaga țară, în timp ce altele sunt până în prezent limitate la anumite subregiuni cum ar fi municipiul Chișinău sau Regiunea Transnistreană [108]. La fel, a fost descris fenomenul prezenței la majoritatea covârșitoare a

tulpinilor din sublinia Beijing din Republica Moldova a mutațiilor în gena *esxW*, cu o potențială selecție pozitivă a micobacteriilor purtătoare a acestora [8].

1.4 Heterogenitatea genetică a *Mycobacterium tuberculosis complex* și dezvoltarea rezistenței la preparatele antituberculoase

În genomul procariotelor, datorită erorilor de replicare în mod constant, se pot produce mutații spontane, rata acestor mutații fiind de 0,0033 la fiecare replicare a ADN-lui. Aceasta este similară pentru un spectru larg de organisme, inclusiv pentru MTBC [109,110]. În cazul multor procariote rezistența la antibiotice poate fi determinată de elementele genetice mobile cum ar transpozoni, integroni sau plasmide precum și de transducție sau transformare, aceasta însă nu este caracteristic și pentru MTBC la care rezistența la medicamente poate să apară numai prin mutații cromozomiale, deși rareori elementele genetice mobile, cum ar fi secvența de inserție IS6110, au fost asociate cu fenomene de rezistență ce apar prin inactivarea genelor critice [111]. Astfel, principala cale de dobândire a rezistenței la preparatele antituberculoase este achiziția mutațiilor în genele care codifică enzime de activare a medicamentului sau reprezintă ținte ale medicamentului.

Într-un scenariu clinic, rezistența la medicamentele antituberculoase ar putea fi de două origini: prima - când tulpinile rezistente sunt transmise unei noi gazde (aceasta se numește rezistența primară la medicamente), cea de a doua apare prin achiziționare pe parcursul tratamentului prin apariția mutațiilor determinante ale rezistenței la medicamente (rezistență secundară sau dobândită) [112–114].

Frecvența și tipul mutațiilor asociate cu rezistența la medicamentele antituberculoase variază în funcție de diferiți parametri ca exemplu: regiunea geografică sau paternul de rezistență.

Mecanismul principal al rezistenței la rifampicină implică blocarea legării rifampicinei la ARN polimeraza bacteriană, ceea ce duce la incapacitatea medicamentului de a inhiba transcripția corectă a ARN-ului. Mutațiile din gena *rpoB* pot afecta situsurile de legare ale rifampicinei la ARN polimerază, ceea ce face ca bacteriile să devină rezistente la acțiunea sa. Această rezistență poate fi dobândită prin mutații spontane sau poate fi transferată între bacterii prin intermediul genelor de rezistență la medicamente [115].

În cazul Isoniazidei, mecanismul principal de rezistență este reprezentat de mutații în gena *katG*, care codifică pentru catalaza-peroxidaza, și în gena *inhA*, care codifică pentru enoil-CoA reductaza. Aceste mutații pot duce la o scădere a activării izoniazidei în interiorul celulei bacteriene [116,117].

Rezistența la fluoroquinolone, cum ar fi levofloxacină, poate fi cauzată de mutații în genele care codifică subunitățile ADN-girazei sau topoizomerazei IV, care sunt ținte ale acestor antibiotice. Aceste mutații pot afecta situsurile de legare ale medicamentului sau pot modifica enzimele în așa fel încât să nu mai fie afectate de acțiunea levofloxacină [118].

În ceea ce privește mecanismul exact de rezistență la bedaquilină nu este pe deplin înțeles, ar putea fi implicate mutațiile în gena *atpE*, care codifică subunitatea C din ATP-sintetaza bacteriană, [119].

În cazul linezolidului mecanismele posibile ar putea include mutații în genele care codifică pentru componentele ribozomale, acestea ar cauza reducerea afinității medicamentului pentru ribozomi [120].

Rezistența la cicloserină poate fi asociată cu mutații în gena *ddl*, care codifică pentru D-alanil-D-alanin ligaza, enzima care este ținta principală a cicloserinei. Mutațiile în această genă pot duce la o reducere a afinității cicloserinei pentru ligază, ceea ce face ca bacteriile să devină rezistente [121].

Rezistența la amikacină și alte aminoglicozide poate fi cauzată de mutații în genele care codifică 16S rRNA pentru subunitatea ribozomală 30S, ce reprezintă situsurile de legare pentru aceste antibiotice. Mutațiile pot interfera cu legarea medicamentului sau pot reduce eficiența acestuia în inhibarea sintezei proteice bacteriene [122].

În cazul etambutolului rezistența *M. tuberculosis complex* este cauzată de mutații în gena *embB*, care codifică pentru enzima arabinosiltransferaza, implicată în sinteza peretelui celular bacterian. Mutațiile în această genă pot modifica structura enzimei astfel încât etambutolul să nu mai fie eficient în inhibarea sintezei peretelui celular [123].

Rezistența la pirazinamidă poate fi cauzată de mutații în gena *pncA*, care codifică pentru enzima pirazinamidaza. Această enzimă este necesară pentru conversia pirazinamidei într-un metabolit activ în interiorul celulei bacteriene. Mutațiile în această genă pot reduce activitatea pirazinamidazei, ceea ce face ca bacteriile să devină rezistente la acțiunea pirazinamidei [125,126].

Rezistența la PAS este datorată mutațiilor în gena *folC*, ce codifică pentru dihidropteroat sintetaza, enzima care este ținta principală a PAS. Mutațiile din această genă pot duce la o scădere a afinității PAS pentru dihidropteroat sintetaza, ceea ce face ca bacteriile să devină rezistente la acțiunea sa [127].

Mecanismul exact de rezistență la delamanid nu este pe deplin înțeles. Cu toate acestea, s-a sugerat că mutațiile în genele implicate în metabolismul medicamentului sau în mecanismele sale de acțiune ar putea contribui la dezvoltarea rezistenței. Studiile sunt în curs pentru a identifica aceste mecanisme în detaliu [128].

Tabel 1. Genele *M. tuberculosis complex* de importanță majoră și mutațiile acestora asociate cu rezistența înaltă sau redusă la preparatele antituberculoase [91,124]

Medicament	Genă	Produsul genei	Nr. mutații ADN	Mutații asociate cu rezistență înaltă	Mutații asociate cu rezistență redusă
Isoniazida	katG	Catalaza	Peste 60	S315I, S315N și S315T	-
	inhA	Catalaza	Peste 60	c-15t cu I194T și c-15t cu S49A	c-15t
Rifampicina	rpoB	ARN polimeraza	Peste 50	peste 20 de mutații, S531L fiind cea mai frecventă	D516Y, H526L, L533P, L511P, H526N și I572F
Bedaquilina	atpE	ATP sintetaza	Peste 30	A83G, A83T, G167C și G187C	-
	Rv0678	Hidroxilaza	Peste 20	Q22L, T33A, S63R, I67fs, R72W, R135G și L136P	185ins_cag
	pepQ	Dipeptidaza	Peste 30	necunoscut	-
Levofloxacina și Moxifloxacina	gyrA	ADN-giraza	Peste 40	G88C, D94G, D94H, D94N și D94Y	D89N, A90V, S91P și D94A
	gyrB	ADN-giraza	Peste 30		D461H, D461N, D499D și A504V
Linezolid	rplC	Proteina ribozomală 50S	Peste 10	T460C	-
	rrl	Proteina ribozomală 23S	Peste 10	g2299t, g2814t	-
Clofazimina	Rv0678	Hidroxilaza	Peste 30	peste 30 de mutații cunoscute (Q22L, T33A, S63R, I67fs, R72W, G74A, T131C, R135G, I36P, C204A)	-
Cicloserina	alr	Alanina racemaza	Peste 10	t-8c, M319T, Y364D, Y364C, R373L și R373G	-
Amikacina	rrs	ARNr 16S	Peste 50	a1401g și a1484t	eis c-14t și rrs c1402t
Etambutol	embA embC	Arabinosiltransferaza Proteină membranară	Peste 10	c-8t, c-12t și c-16t (frecvent în asociere cu mutații în embB)	-
	embB	Arabinosiltransferază	Peste 100	M306I, M306V, D354A, G406D, G406C, G406S și Q497R	-
Pirazinamidă	pncA	Pirofosfamidaza	Peste 300	Peste 300	V180I, A170V, D110G, S65A și E37V
Acid para - amino - salicilic (PAS)	folC	Dihidrofolat reductaza	Peste 20	E153A, E153G, S150G, F152S, I43T, I43A și E40G	-
	ribD	Riboflavin sintetaza	Peste 20	g-12a	-
Delamanid	ddn	Dihidropteroat sintetaza	Peste 20	W88Stop	-
	fbiA	Dihidrofolat reductaza	Peste 20	D49Y și L250Stop	-

Pentru rezistența la preparatele antituberculoase se cunoaște că există mutații ce sunt asociate cu rezistența înaltă sau rezistență joasă (Tabel 1).

Mutațiile compensatorii

Mutația este principala sursă de variabilitate în orice organism. Fără aceasta, selecția naturală nu poate funcționa, iar organismele nu se pot adapta la noile condiții de mediu. Mutația este, de asemenea, o sursă de defecte biologice. Altfel spus, multe dintre mutații nu sunt neutre pentru metabolismul bacterian, dar determină o scădere a capacităților biologice a microorganismului [111].

Majoritatea antibioticelor țintesc periclitarea celor mai importante funcții bacteriene, astfel mutațiile care conferă rezistență ar putea determina o creștere mai lentă și o viabilitate mai redusă a micobacteriei, gradul afectării acestor funcții variază de la o mutație rezistentă la alta. Cu toate acestea, bacteriile reușesc să acumuleze mutații secundare care restabilesc parțial sau total funcția compromisă (mutații compensatorii). Mutațiile compensatorii (MC) sunt diferite pentru fiecare antibiotic, ele explică în mare măsură de ce anumite mutații sunt frecvent întâlnite în grupurile cu transmitere ridicată, în timp ce altele sunt mai puțin frecvente, rare sau nu se întâlnesc niciodată în izolatele clinice. MC ilustrează modul în care rezistența la medicamente afectează bacteriile și modul în care bacteriile evoluează pentru a depăși efectele antibioticelor [129].

Studii recente asupra genomului micobacterian atât pe izolate clinice, cât și modele de laborator, au arătat că rezistența la rifampicină, medicamentul de primă linie împotriva tuberculozei, este foarte puternic asociată cu selecția mutațiilor compensatorii în diferite subunități ale ARN-polimerazei. Acest fenomen de compensare a rezistenței poate fi observat și la alte medicamente. Cunoașterea frecvenței și mecanismelor acestor fenomene de compensare ar putea fi utilizate pentru a dezvolta metode mai bune de diagnostic și a optimiza tratamentul tuberculozei [130].

Au fost observate scăderea vitalității tulpinilor MTBC mutante cu defect de structură în subunitatea β a ARN-polimerazei (RNAP). În izolatele clinice, acest defect de vitalitate poate fi ameliorat prin prezența unor mutații secundare în domeniul dublu-psi β -baril (DPBB) al subunității β' a RNAP. În tulpina mutantă, purtătoare a mutației β S450L, aceste defecte sunt atenuate de prezența mutațiilor secundare/compensatorii în domeniul DPBB al subunității β' [131].

La fel, a fost raportat că, tulpinile L2 MDR purtătoare a mutației RpoB S450L și a mutației compensatorii în gena ce codifica sinteza ARN-polimerazei au o capacitate de transmitere mai mare în comparație cu tulpinile MDR doar cu mutația RpoB S450L. În același timp, fenomenul nu

a fost observat în cazul tulpinilor MDR purtătoare ale altor mutații în RpoB decât mutația S450L [111].

În cazul tulpinilor MTBC cu rezistență la rifampicină cauzată de mutația în gena rpoB au fost identificate mutații compensatorii în genele rpoA și rpoC care pot spori viabilitatea tulpinilor rezistente. Studiile genomice recente au identificat mai multe mutații rpoB non-rezistente care au apărut împreună cu mutațiile rezistente în izolatele clinice fără mutații în genele rpoA/rpoC și care pot conferi o compensare a capacității de adaptare [132]. Mutațiile non-RRDR ar putea modifica centrul activ RpoB sau prin modificări ale interacțiunilor dintre subunitățile ARN polimerazei. Astfel, aceste mutații compensatorii ar putea fi utilizate ca markeri moleculari suplimentari pentru a prezice capacitatea de adaptare a tulpinilor de MTBC rezistente la medicamente [133].

În unele studii a fost susținut rolul mutațiilor rpoC în transmiterea tuberculozei multirezistente, ilustrând modul în care interacțiunile epistatice dintre mutațiile care conferă rezistență la medicamente, mutațiile compensatorii și diferitele medii genetice ale tulpinilor ar putea influența evoluția compensatorie în MTBC rezistente la medicamente [134].

Cu toate acestea, datele expuse mai sus, sunt contrazise de rezultatele unui studiu ce a studiat mutațiile compensatorii la tulpinile MTBC MDR din cel mai populat oraș din China pe parcursul a 4 ani, cât și rolul lor în transmiterea tuberculozei MDR, fiind demonstrat că rata mutațiilor compensatorii în genele rpoA, rpoB sau rpoC nu a fost mai mare la tulpinile MTBC ce formează clustere [135].

Mutațiile homoplazice

Homoplazia este fenomenul de dezvoltare a caracterelor în cadrul unor specii diferite, care se aseamănă între ele și au aceleași funcții, dar care nu au origine ancestrală comună. Aceste caractere apar prin evoluție convergentă și prin urmare sunt analoge, nu omoloage, între ele. De exemplu, aripile insectelor, ale păsărilor și ale liliecilor, care sunt toate folosite pentru zbor, sunt homoplazice (ceea ce înseamnă: similare ca formă și structură, dar nu și ca origine) [136]. Un arbore filogenetic descrie relațiile ancestrale dintre un grup de organisme în baza secvențelor de nucleotide. Acuratețea relațiilor ancestrale descrise în arborele filogenetic se bazează pe faptul că marea majoritate a diferențelor nucleotidice, care definesc arborele, rezultă din evenimente de substituție care au avut loc o singură dată. Homoplazia definește cazul când aceeași substituție apare de mai multe ori în mod independent în etape evolutive separate [137]. La fel, am putea spune că homoplazia este apariția unor genotipuri care sunt identice prin stare, dar nu și prin descendență. Aceasta apare printr-o serie de mijloace, inclusiv evoluția convergentă și inversă și transferul orizontal de gene [138].

SNP-urile homoplazice sunt considerate markere importante ale unei presiuni selective pozitive, și prin urmare, ale evoluției adaptaționale pentru trăsături relevante din punct de vedere clinic, cum ar fi rezistența la antibiotice și virulența. Secvențele ADN ale agenților patogeni bacterieni suferă mutații în permanență, majoritatea modificărilor sunt dăunătoare sau neutre, dar uneori o mutație duce la o schimbare funcțională care permite agentului patogen să scape anumitor amenințări. Aceste modificări mutaționale aleatorii sunt atât de rar benefice, încât, atunci când apar în paralel în izolate înrudite la distanță (SNP homoplazice) devin obiectul unei selecții pozitive, aceasta deoarece conferă bacteriei un avantaj de adaptare [139].

Pentru a putea cuantifica fenomenul de homoplazie din cadrul unui grup de microorganisme este recomandată calcularea indicelui de consistență (IC). Acesta este egal cu raportul m/s unde „m” este numărul minim de modificări ale caracterului care ar fi trebuit să aibă loc în arborele filogenetic, iar „s” este numărul real de modificări care au avut loc. Un indice de consistență apropiat de 1 indică homoplazie redusă sau absentă; un IC apropiat de 0 indică homoplazie importantă. Indicele de consistență poate fi privit ca un indicator al credibilității reconstrucției filogenetice [140].

La ora actuală studiile care analizează mutațiile homoplazice la MTBC sunt reduse ca număr. Un studiu recent a încercat să analizeze dacă fenomenul de homoplazie în tulpinile de MTBC rezultă din procese stocastice sau este rezultatul selecției naturale, concluzia obținută a fost în defavoarea selecției naturale, cel puțin de la nivelul ramificării ancestrale a celor trei linii moderne de MTBC [141].

Homoplazia este adesea observată în cazul mutațiilor de rezistență la medicamentele antituberculoase și poate servi drept un indicator puternic al selecției pozitive [142]. Altfel spus SNP-urile homoplazice au o asociere puternică cu rezistența la medicamente. Cele mai multe dintre aceste mutații sunt deja bine cunoscute. Cu toate acestea, au fost identificate o serie de mutații noi care manifestă caracter homoplazic, spre exemplu mutațiile asociate cu rezistența la streptomycină. S-a demonstrat experimental că un SNP din regiunea intergenică din amonte de Rv0079 crește activitatea transcripțională a genei din aval, sugerând că SNP-urile homoplazice intergenice ar putea avea efecte asupra fiziologiei celulelor bacteriene. Sunt date din literatură, care evidențiază potențialul mutațiilor homoplazice de a produce modificări fenotipice, astfel că sub presiune selectivă și în timpul interacțiunii cu gazda, mutațiile homoplazice pot conferi avantaje pentru MTBC [139].

La fel, a fost analizată asocierea dintre severitatea leziunilor radiografice în TB pulmonară și SNP-urile homoplazice ale MTBC. În rezultat două mutații au fost semnificativ asociate cu leziuni radiologice mai extinse Rv2828c și rpoC 1040. În același timp, mutația rpoB S450L a fost

asociată cu leziuni radiologice mai puțin extinse, ceea ce sugerează un cost de viabilitate pentru această mutație în vivo [111,132,143].

Într-un alt studiu au fost identificate trei gene cu caracter homoplazic care se asociază cu fenotipul TB pulmonare. Astfel, variațiile genetice în Rv0218 și absența Rv3343c și nanK corelează cu fenotipul bolii determinate de microorganismele din ramurile terminale ale arborelui filogenetic analizat [144]. De remarcă că gena Rv0218 codifică o proteină care ar putea fi implicată în interacțiunea gazdă-patogen prin modificarea recunoașterii microorganismului precum și în virulența micobacteriei.

1.5 Concluzii la capitolul 1

1. Analiza liniilor filogenetice de distribuție a *Mycobacterium tuberculosis* multidrog-rezistent evidențiază diversitatea genetică a tulpinilor MDR și posibilele căi de transmitere a rezistenței la medicamente. Această înțelegere este esențială pentru gestionarea eficientă a focarelor de tuberculoză MDR și dezvoltarea de strategii de control adaptate la nivel global și regional.
2. Analiza mutațiilor asociate cu rezistența înaltă și rezistența joasă la preparatele antituberculoase evidențiază complexitatea mecanismelor de rezistență la *Mycobacterium tuberculosis*, având o importanță majoră în dezvoltarea de noi medicamente și regimuri terapeutice care să depășească eficient obstacolele create de rezistența bacteriană și să îmbunătățească gestionarea tuberculozei.
3. Examinarea mutațiilor compensatorii și homoplazice ale *Mycobacterium tuberculosis* multidrog-rezistent este esențială pentru înțelegerea adaptării bacteriei la tratamentele antituberculoase. Aceste mutații pot influența rezistența la medicamente și succesul terapiei, subliniind necesitatea unei monitorizări continue și a dezvoltării de strategii personalizate pentru abordarea infecțiilor cu tulpini rezistente la medicamente.

2. DIVERSITATEA GENOTIPICĂ A *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* ÎN REPUBLICA MOLDOVA ÎN CONTEXTUL DEZVOLĂȚII REZISTENȚEI ANTIMICORBINE ȘI AL CARACTERISTICILOR CLINICE ALE BOLII

În ultimele decenii, tuberculoza (TB) a continuat să fie o cauză majoră de morbiditate și mortalitate la nivel mondial [145]. În prezent, unul dintre cele mai importante obstacole în reducerea impactului tuberculozei asupra sănătății publice este creșterea continuă a incidenței tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis Complex* (MTBC), rezistente cel puțin la izoniazidă și rifampicină [124]. O situație deosebit de nefavorabilă în ceea ce privește controlul TB MDR este observată în țările din Europa de Est, unde prevalența TB MDR în rândul pacienților nou diagnosticați cu TB este de aproximativ 30%, în timp ce în rândul cazurilor noi de tratament depășește 50% [146]. Printre factorii care au favorizat selecția clonelor MDR în această zonă geografică se consideră a fi întreruperea aprovizionării cu medicamente și implementarea inadecvată a regimurilor de tratament. Complementar la aceasta, măsurile deficiente ale controlului infecției, împreună cu întârzierile în diagnosticare și tratament, contribuie la transmiterea activă a tulpinilor rezistente la medicamente și la extinderea epidemiei de TB MDR [147]. La fel, se presupune că caracteristicile genetice ale tulpinilor de *M. tuberculosis complex* contribuie la selecția, transmiterea și toleranța la medicamente a MTBC [148]. În special, tulpinile MTBC ce aparțin liniei 2 și liniei 4 au un succes excepțional în țările cu o povară mare de TB MDR din întreaga lume [149–151]. Evoluția compensatorie, care atenuază defectele de adaptabilitate induse de mutațiile care conferă rezistență la medicamente, a fost propusă ca mecanism care conferă un avantaj de transmitere a MTBC MDR [139,149]. Diverse linii genotipice ale *M. tuberculosis complex* pot manifesta diferențe în concentrațiile minime inhibitorii față de fluorochinolone și bedaquilină [152,153]. În același timp, impactul clinic al diferențelor genetice dintre tulpinile MTBC este mai puțin studiat, însă considerând asocierile dintre variabilitatea rezistenței la medicamente și genotipul micobacterian, cele din urmă ar putea modula și rezultatele tratamentului. În prezentul studiu a fost evaluat impactul caracteristicilor genetice ale *M. tuberculosis complex* asupra transmisibilității, adaptării biologice și caracteristicilor clinice ale TB MDR din Republica Moldova.

2.1 Material și metode

A fost realizat un studiu de cohortă retrospectiv, fiind analizate izolatele de MTBC selectate din biobanca Laboratorului Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei (LNR) din

Chișinău, Republica Moldova. Biobanca LNR conține izolate clinice stocate în mod curent, colectate în scop diagnostic la pacienții cu TB MDR, internați la Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” (un spital terțiar de tuberculoză din care face parte și LNR), precum și cele trimise la LNR de la 3 laboratoare regionale de TB, situate în regiunile de nord-est și centru ale țării. Culturile izolate din laboratoarele regionale, sunt trimise la LNR, în scopul evaluării controlului calității sau pentru teste suplimentare sau repetate, atunci când acest lucru este necesar.

Pentru acest studiu, a fost efectuată o selecție aleatorie a izolatelor de MTBC MDR din biobanca LNR, fiind selectate 60 de izolate pentru 6 ani consecutivi (2013-2018). Pentru selecția aleatorie a fost aplicată funcția "ddply" din programul R "plyr". Probele rezultate în urma selectării (n=360) au fost re-însămânțate pe mediul Lowenstein-Jensen în conformitate cu recomandarea OMS [25] 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 (figura 1) 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).

Caracteristicile clinico-epidemiologice a mediului de implementare a studiului

Republica Moldova este o țară est-europeană cu o povară mare a TB MDR, cu o incidență medie estimată a TB de 74 de cazuri la 100000 de locuitori în 2022 [154]. În cadrul Programului Național de Răspuns la Tuberculoză, îngrijirile medicale acordate bolnavilor de TB sunt gratuite și asigurate de un medic pneumolog specializat în îngrijirea TB (ftiziopneumolog). Diagnosticul și tratamentul TB MDR este reglementat de protocolul național TB la adulți, care este în concordanță cu recomandările OMS privind diagnosticul și tratamentul TB MDR [155]. În conformitate cu acesta, probele de la toți pacienții cu TB sunt testate cu GeneXpert MTBC/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, SUA), se efectuează culturi de spută pe mediul Löwenstein-Jensen și MGIT, precum și un DST bazat pe cultură pentru medicamentele antituberculoase de prima și a doua linie. Spectrul de medicamente de linia a doua testate ar putea varia din cauza capacităților de laborator la un anumit moment dat și a cererilor medicului curant. De obicei, tratamentul TB MDR este inițiat în spital, unde pacientul este internat cel puțin până când se realizează conversia frotiului de spută și se selectează un regim de tratament eficient. După externarea din spital, pacienții continuă tratamentul la locul de reședință, sub observația directă a unui medic de familie sau a unui ftiziopneumolog. Rezultatul și eventualele ajustări ale schemelor inițiale de tratament a TB MDR sunt evaluate de către Comitetul Național pentru Managementul TB MDR [156]. În

timpul tratamentului, pacienții sunt urmăriți lunar prin sputocultură până la conversia culturii. După conversia culturii, sunt efectuate trimestrial culturile de spută. La cererea medicului curant se pot efectua evaluări suplimentare ale culturilor de spută. Complementar monitorizării microbiologice, pacienții beneficiază de o evaluare clinică periodică, radiografie pulmonară trimestrială și analize de sânge relevante.

Izolarea ADN genomic al MTBC

Tulpinile de MTBC au fost inoculate și cultivate pe mediul Löwenstein-Jensen la 37 °C, până la înregistrarea creșterii clar vizibile. Ulterior coloniile au fost transferate într-un tub de microcentrifugare (2,0 ml) care conținea 400 μl de tampon TE și au fost încălzite timp de 20 de minute la 80 °C pentru omorârea micobacteriilor. După 3 min de centrifugare la 13000 r, a fost eliminat supernatantul și adăugat 400 μl de tampon TE, urmat de o agitare și vortexare pentru a separa celulele. Apoi au fost adăugate 50 μl de lizozim (10 mg/ml), vortexate și apoi incubate peste noapte la 37 °C. A doua zi, s-a adăugat 70 μl de SDS 10 %, 5 μl de proteinază K (10 mg/ml), au fost vortexate ușor probele, iar soluția obținută a fost incubată 10 minute la 65 °C. Ulterior, au fost adăugate 100 μl de NaCl 5M, 100 μl de CTAB/NaCl (preîncălzit la 65 °C), urmat de vortexare și incubare timp de 10 min la 65 °C. Apoi s-au adăugat 750 μl de amestec cloroform/izoamiloolcool (24:1), au fost inversate tuburile de câteva ori și centrifugate la temperatura camerei timp de 15 min la 13000 r. Supernatantul apos a fost transferat cu grijă într-un nou tub de microcentrifugare, unde s-a adăugat 0,6 volum de izopropanol pentru a precipita acizii nucleici timp de 30 de minute la -20 °C (sau mai mult). Apoi au fost centrifugate timp de 10 minute la temperatura camerei la 13000 r, a fost aruncat supernatantul și spălat ADN-ul în 0,5 ml de etanol 75 % rece, inversând tuburile de câteva ori, urmat de o centrifugare de 5 minute la temperatura camerei și înlăturarea cu grijă a supernatantului. "Pelerina" de ADN a fost uscată la 60 °C timp de aproximativ 10 minute, iar ADN-ul a fost dizolvat în cele din urmă în 100 μl de tampon TE la 37 °C timp de 30 de minute sau la temperatura camerei până când ADN-ul a fost complet dizolvat.

Secvențierea întregului genom și predicția genotipică a rezistenței la medicamente

ADN-ul MTBC extras a fost supus secvențierii întregului genom (WGS) la Centrul de Cercetări Borstel, Germania. Secvențierea realizată a avut o acoperire medie a genomului de cel puțin 50x, utilizând librării de ADN de tip paired-end și tehnologia Illumina (Nextera-XT și NextSeq500) în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Illumina, San Diego, CA, SUA). Fișierele Fastq (date brute de secvențiere) au fost transmise la European Nucleotide Archive și au fost cartografiate în baza genomului de referință *M. tuberculosis complex* H37Rv (ID GenBank: NC_000962.3) utilizând MTBseq pipeline [157].

Au fost detectate mutațiile asociate rezistenței (polimorfisme de un singur nucleotid -SNP, inserții, deleții) și notificate conform catalogului de mutații din cadrul Laboratorului Supranațional de Referință (LSR) pentru Micobacterii, Centrul de Cercetări Borstel, Germania, pe baza informațiilor disponibile la data de 3 iulie 2020. Mutațiile implicate în rezistența la medicamente au avut cel puțin 2 citiri în ambele direcții ale catenelor moleculei de ADN și o citire care să indice alela cu cel puțin un scor phred de 20. Pentru analiza filogenetică, au fost extrase și cercetate SNP-urile din întregul genom cu o acoperire de cel puțin 4 citiri atât direcția înainte, cât și inversă, cu o frecvență a alelei de cel puțin 75 % și patru lecturi care numesc alela cu cel puțin un scor phred de 20. În alinierea catenelor, SNP-urile trebuiau să îndeplinească pragurile menționate mai sus în 95% din toate izolatele.

Au fost luate în considerare mutațiile compensatorii putative, adică posibil asociate cu o adaptabilitate crescută a tulpinilor MDR, în genele *rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *thyX* și *ahpC*, excluzând mutațiile cunoscute care conferă rezistență la medicamente, pe baza catalogului de mutații utilizat la LSR, Centrul de Cercetări Borstel [158]. Pentru analiza tulpinilor pe grupuri a fost generată o matrice de distanțe SNP perechi și au fost grupate izolatele cu o distanță maximă de 5 SNP între două izolate.

Analiză filogenetică

Reconstrucția filogenetică a fost realizată cu o abordare de maximă verosimilitate folosind FastTree v2.1.11 [159] cu modul de dublă precizie, pe baza unei alinieri de secvențe concatenate și utilizând un model de substituție general reversibil în timp (GTR). Pentru identificarea situsurilor care ar putea fi supuse unei selecții pozitive, a fost utilizat HomoplasyFinder [137]. Vizualizarea arborelui filogenetic a fost realizată în ITOL versiunea 6.5.8 [160].

Analiza statistică

Diferențele dintre valorile medii au fost comparate cu testul Wilcoxon, iar diferențele dintre proporții au fost comparate cu un test exact a lui Fisher. Valorile *p* mai mici de 0,05 au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic. Pentru prezentarea grafică a datelor de comparație s-a utilizat programul GraphPad Prism versiunea 9.4.0. Raporturile de probabilitate (OR) ale parametrilor clinici și asocierea acestora cu linia genotipică MTBC, rezultatul tratamentului și boala cavitara au fost cuantificate cu ajutorul modelelor de regresie logistică univariate și multivariate utilizând R versiunea 4.1. și funcția *glm*.

Considerații etice

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

Comitetul Etic Instituțional al Institutului de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc", Chișinău, Republica Moldova (nr. 1 din 05.07.2019).

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

În perioada de studiu, 2013-2018, în Republica Moldova au fost diagnosticați cu TB MDR, 5856 de pacienți, dintre care 1255 de pacienți aveau cel puțin o tulpină de *M. tuberculosis complex* izolată și stocată în biobanca Laboratorului Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei (LNR). Pentru acest studiu, au fost selectate aleatoriu 360 de izolate din anul 2013 până în anul 2018, fiind incluse câte 60 de izolate pentru fiecare an (Figura 3).

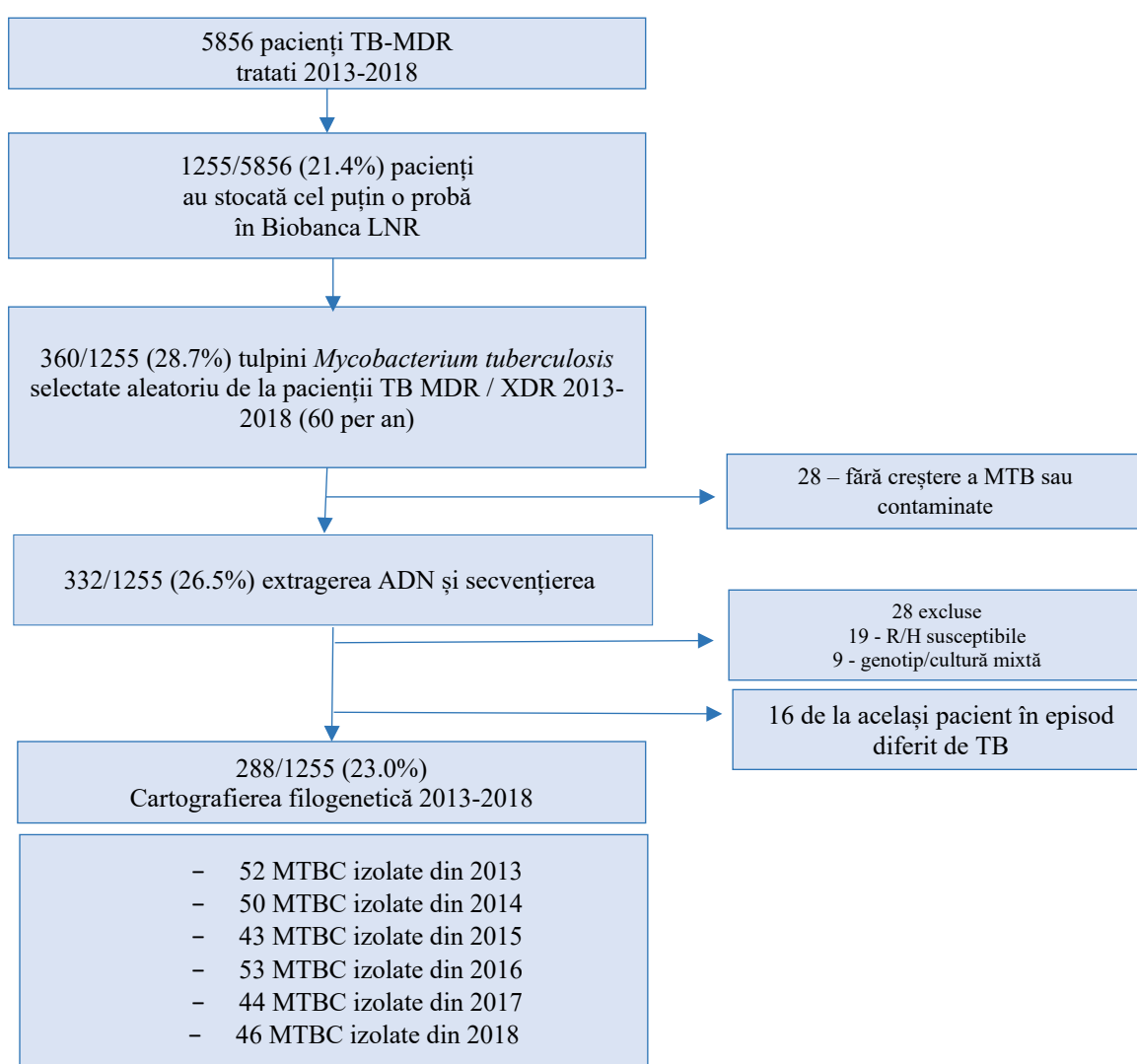


Figura 3. Selectarea tulpinilor de *M. tuberculosis* incluse în analiza filogenetică

Din tulpinile selectate, din studiu au fost excluse 72, dintre care în cazul la 28 de tulpini la re-însămânțare nu a fost obținută creșterea și nu a putut fi extras ADN-ul, 19 izolate fenotipic MDR erau lipsite de orice mutație de rezistență genotipică pentru izoniazidă sau rifampicină, 9

izolate aveau alele heterogene în SNP-uri filogenetice care definesc (sub)linia de descendență, indicând o posibilă infecție mixtă. Extragerea și analiza datelor pacienților din baza de date a relevat alți 16 pacienți care au fost incluși cu două izolate în baza de date, dintre care a fost păstrat doar primul izolat pentru acest studiu. Astfel, 288 de izolate au fost incluse în analiza finală.

Dintre cele 288 de tulpini *M. tuberculosis complex* analizate, 124 (43%) au fost clasificate ca aparținând liniei 2 (L2), iar 164 (57%) tulpini - liniei 4 (L4) (Figura 5). Între tulpinile L2, au fost identificate următoarele sublinii, Asia Centrală (Central Asia) - 56%, focarul W148 din Europa/Rusia (Europe/Rusian W148 outbreak) - 22%, focarul din Asia Centrală (Central Asia outbreak) - 17% și 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) (Figura 4). Tulpinile din linia 2, cât și cele din linia 4 au fost distribuite în mod egal în regiunea studiată, iar proporțiile nu s-au schimbat în timp ($p > 0,09$) (Figura 6 A).

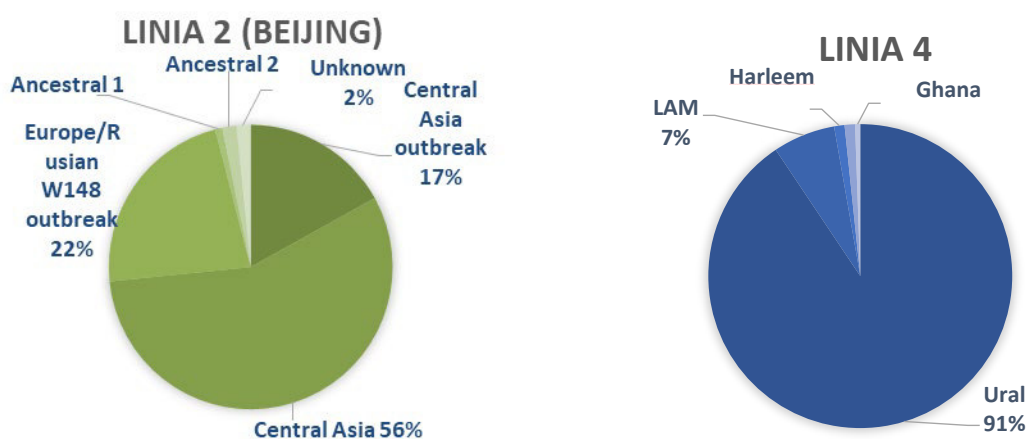


Figura 4. Rata subliniilor genotipice de *M. tuberculosis complex*

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 fost grupate în 11 cluster moleculare folosind o distanță genetică de 5 SNP. În total o sută patru (63,4%) tulpini L4 aparțin la unul dintre aceste cluster. Cel mai mare cluster L4 a cuprins 75 de tulpini 4.2.1/Ural, pe lângă acesta au fost identificate și 10 cluster mai mici ce cuprindeau de la 2 la 8 tulpini.

Dintre tulpinile genotipului L2, 45 de tulpini (36,3%) au făcut parte din 16 cluster diferite, inclusiv cele mai mari trei cluster, fiecare cuprinzând 6 tulpini. Proporția globală de tulpini L4 grupate în cluster a fost mai mare decât în rândul tulpinilor L2 ($p < 0,001$), (63% pentru L4 față de 36,3% pentru L2, $p < 0,001$), (Figura 6 B).

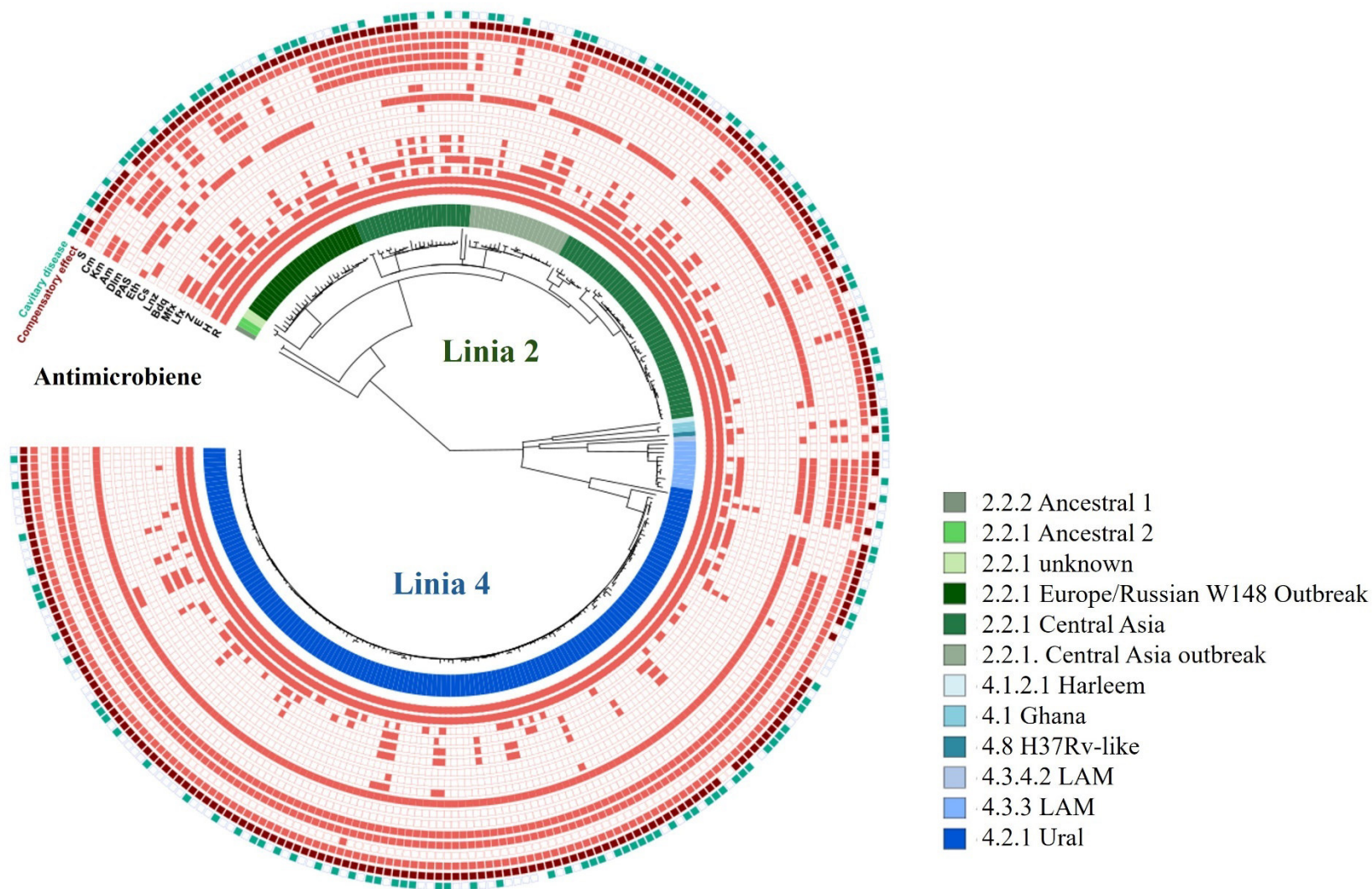


Figura 5. Arborele filogenetic a tulpinilor MTBC M/XDR din Republica Moldova, 2013-2018

Capacitatea înaltă de transmitere a tulpinilor L2 ar putea rezulta din interacțiunile epistatice ale mutației RpoB S450L care conferă rezistență la rifampicină, mutațiile compensatorii în ARN-polimeraza și alte caracteristici genetice preexistente [161]. În studiul realizat, 86,4% dintre tulpinile de *M. tuberculosis complex* MDR prezentau mutația S450L în gena rpoB, cu o frecvență de 43% în L2 și 57% în L4. Tulpinile care prezentau mutația S450L a genei rpoB au avut o rată de clusterizare mai mare (55,8% vs 25,6%, p=0,0005). De asemenea, între tulpinile L4 cu mutații rpoB S450L, rata de clusterizare a fost mai mare decât la cele fără mutație (66% vs 31,8%, p=0,0016). Cu toate acestea, diferența în ceea ce privește rata de clusterizare în cazul tulpinilor L2 cu și fără rpoB S450L a fost ne semnificativă din punct de vedere statistic (39,2% vs 17,6%, p=0,1068).

În calitate de un alt marker surogat pentru transmitere recentă 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 ramurilor terminale mai scurtă în comparație cu tulpinile L2 ($5,479 \times 10^{-4}$ [ÎC (intervalul dintre cuartile) $3,656 \times 10^{-4} - 2,019 \times 10^{-3}$] 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 în regiunea studiată (Figura 7 B).

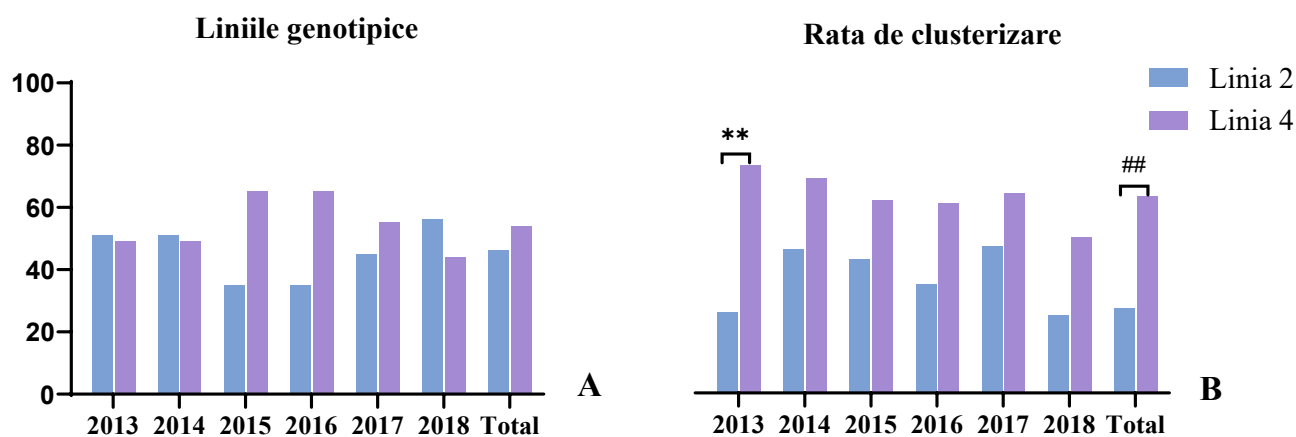


Figura 6. Rata liniilor de *M. tuberculosis complex* (A) și de clustere moleculare (B) pe perioada 2013-2018 (** - p<0,01, p<0,0001, nu indică faptul că valorile p sunt > 0,05)

Determinantele rezistenței genotipice

În ceea ce privește determinanții genetici ai rezistenței la medicamente, în cazul tulpinilor L4 au fost identificate în medie un număr ușor mai mare de mutații care conferă rezistență la preparatele antituberculoase în comparație cu tulpinile L2 (7 [ÎC 6-7] față de 6 [ÎC 5-6], p = 0,0001, Figura 7 C).

La tulpinile liniei L4 nu a existat nici o diferență semnificativă în ceea ce privește determinanții rezistenței la medicamente între L4.2.1/Ural și alte izolate L4 ($p = 0,91$). Însă, s-a observat că mai multe tulpini L2 decât L4 au fost rezistente la fluorochinolone, PAS, pirazinamidă, etambutol, amikacină și capreomicină (Figura 7 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 streptomicină. Doar un singur izolat (L4) a fost rezistent la linezolid, un izolat (L2) a fost rezistent la delamanid și nu s-a găsit niciun izolat cu rezistență genotipică la bedaquilină.

Au fost observate, de asemenea, 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 (Anexa 1).

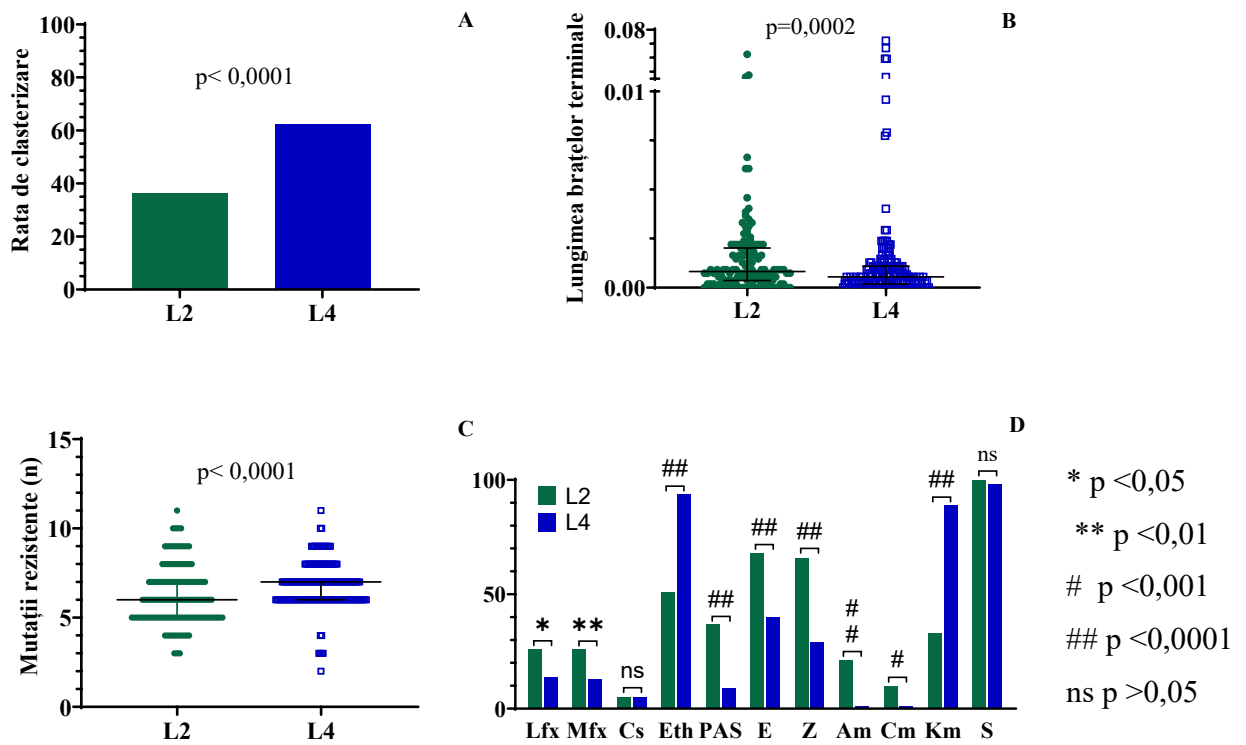


Figura 7. Transmiterea MTBC și rezistența la medicamente în Republica Moldova, 2013-2018

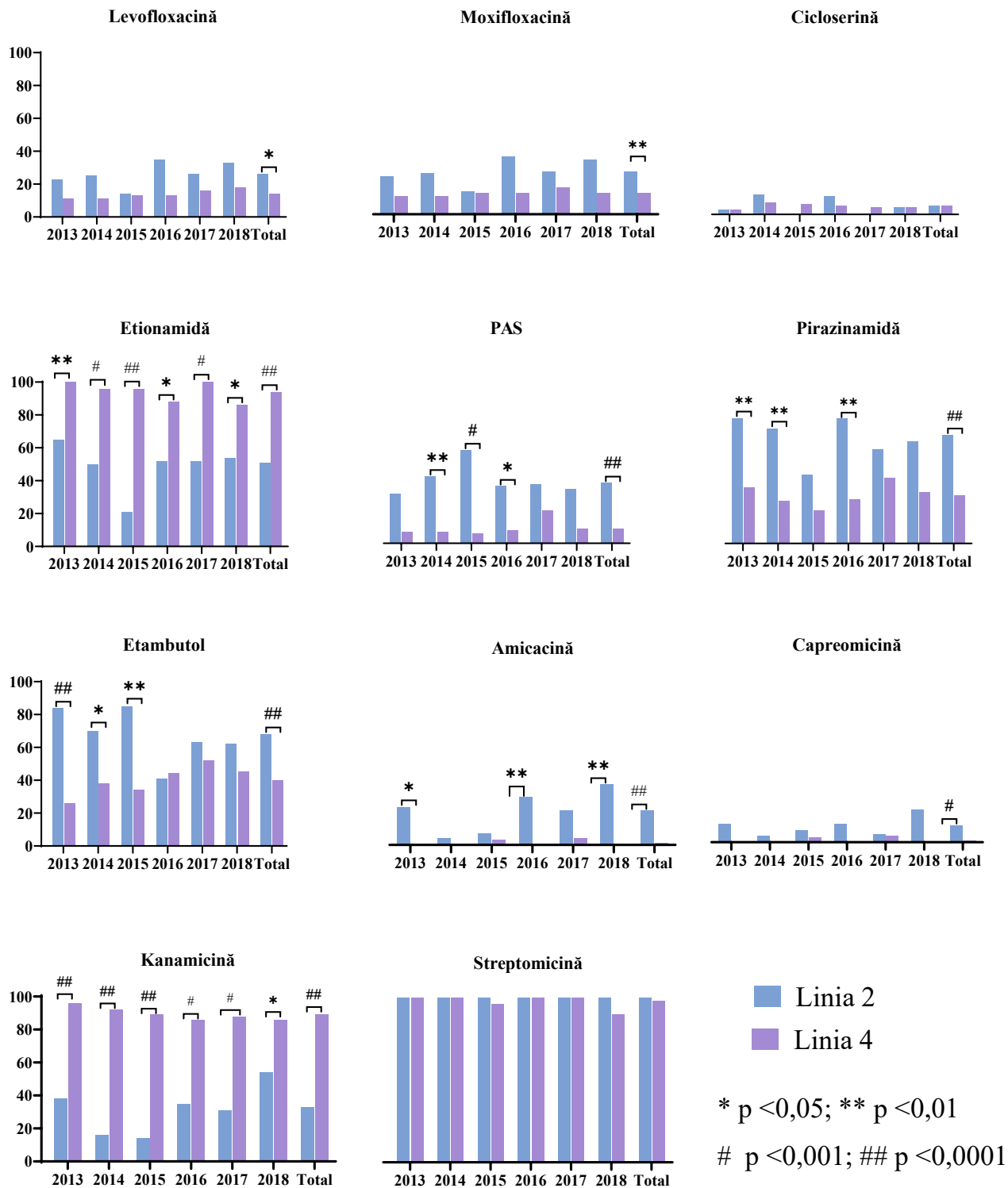


Figura 8. Rezistența genotipică a principalelor linii MTBC în funcție de anul de prelevare a probelor (nu au fost indicate valorile p > 0,05)

Rezistența fenotipică

Rezultatele testelor fenotipice de sensibilitate au fost colectate din registrul electronic SIME TB, forma 06. În urma analizei a fost stabilit profilul de rezistență fenotipică la preparatele antituberculoase H, R, E, S, Z, Eto, Lfx, Cs, Pas, Am, Km, Cm pentru tulpinile L2 de *M. tuberculosis complex* (Figura 9) și tulpinile L4 (Figura 10).

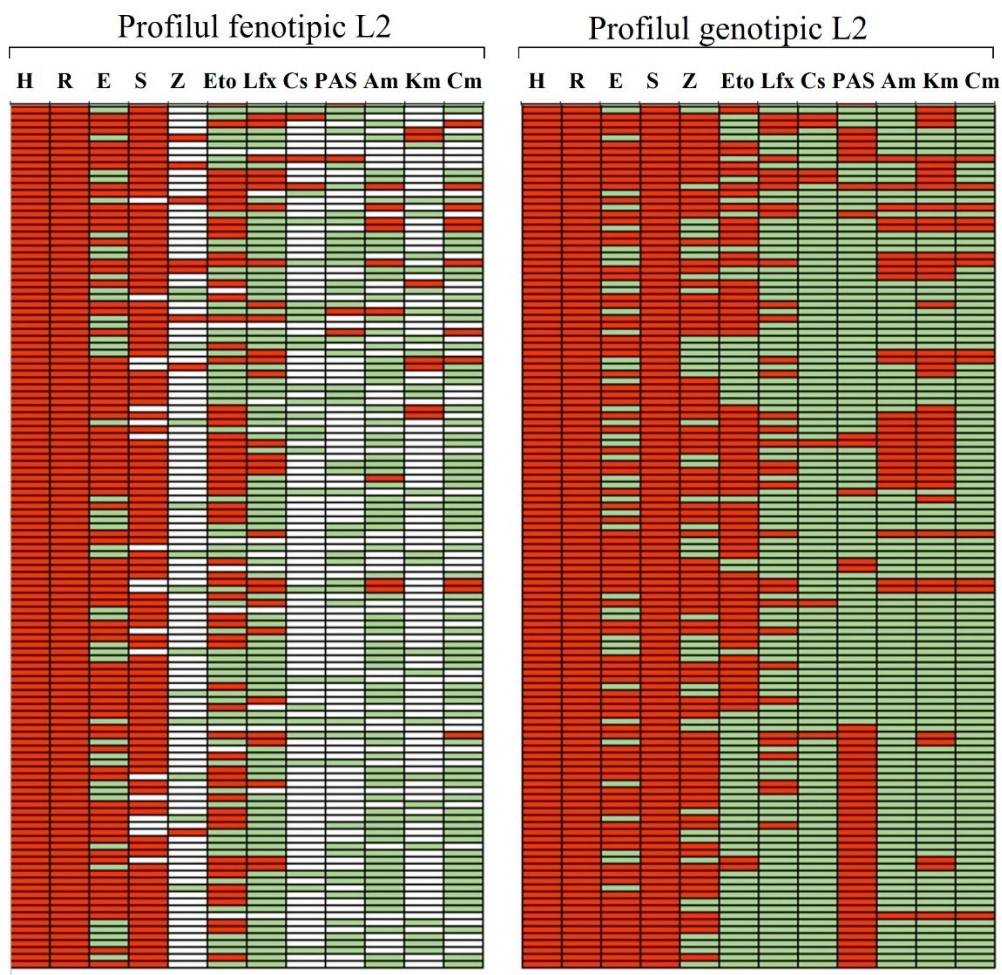


Figura 9. Profilul de rezistență fenotipică și rezistență genotipică pentru tulpinile L2 (culoarea roșie - tulpină rezistentă, verde - sensibilă, alb - nedeterminat)

S-a observat o rată mai mare de rezistență fenotipică la linia 2 pentru preparatele: E, Z, Lfx, Cs, Pas, Am, Cm, în timp ce rata de rezistență fenotipică pentru Eto este mai mare la linia 4 (62,2% vs 52,2%). În cazul streptomycinei și kanamicinei rata de rezistență fenotipică pentru L2 și L4 este similară. Rezistența fenotipică pentru linia 2 la etambutol este 66,1% (82/124) vs linia 4 – 36,6% (60/164), pentru pirazinamină L2 - 38,1% (8/21) versus L4 – 28,6% (8/28), pentru levofloxacină L2 – 25,2% (28/111) comparativ L4 – 10,3% (15/146), pentru cicloserină L2 – 10,7% (3/28), L4

– 6,9% (2/29), pentru PAS L2 – 6,4% (3/47) vs L4 – 5,4% (3/55), pentru amicacină L2 – 11,4% (9/79), L4 – 2,7% (3/109), pentru capreomicină L2 - 14,1% (11/78) vs L4 3,6% (4/110).

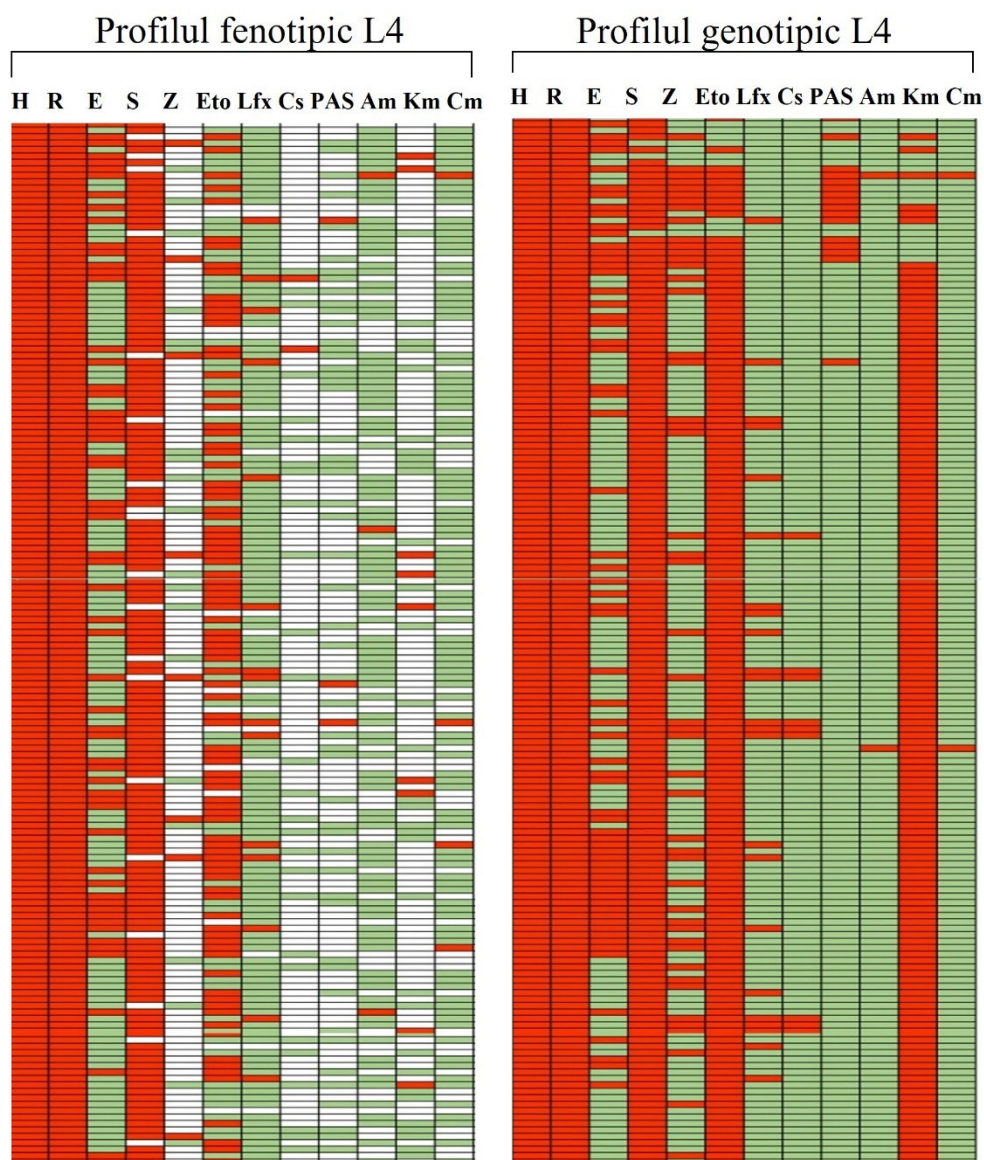


Figura 10. Profilul de rezistență fenotipică și rezistență genotipică pentru tulpinile L4 (culoarea roșie – tulpină rezistentă, verde - sensibilă, alb-nedeterminat)

2.3 Determinante genetice ale *Mycobacterium tuberculosis* cu rol potențial în răspândirea tulpinilor multidrog-rezistente în Republica Moldova

În studiul realizat aproape toate tulpinile secvențiate (259/288, 90%) au fost purtătoare a cel puțin o mutație compensatorie putativă. 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 una dintre genele menționate anterior. Mutații compensatorii au fost găsite în 93,2% dintre tulpinile cu

mutații în rpoB S450L, dintre care 83,9% în gena rpoC și 9,2% în gena rpoB, în timp ce tulpinile fără mutația S450L au avut o rată mai mică (38,4%) de mutații compensatorii, dintre care în gena rpoC (5,1%) și rpoB (33,3%).

Proporția de mutații compensatorii putative 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) (Figura 11 A-D).

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 11 B). Conform reprezentării grafice 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 % $p=0,1$) (Figura 11 F). Nu a existat nicio diferență între prezența/absența unei mutații compensatorii putative în rpoC în ceea ce privește lungimea brațelor terminale și numărul de mutații rezistente la medicamente (Figura 11 F, K). Tulpinile care au suferit 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 11 C, G, L). 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 12 G, Figura 13 C). Nu a existat nicio diferență între prezența/absența mutației compensatorii în rpoA în ceea ce privește numărul de mutații rezistente la medicamente în întreaga cohortă și în fiecare dintre cele două linii principale (Figura 13 G, Figura 11 L). La izolatele purtătoare de mutații compensatorii rpoB nu au existat diferențe în ceea ce privește rata de clusterizare, lungimea brațelor terminale și numărul de mutații rezistente la medicamente comparativ cu tulpinile fără aceste tipuri de mutații, atât în întreaga cohortă, cât și stratificate pe linii (Figura 12, E, Figura 13 A, E). 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

[ÎC 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 cu mutații *thyX* (Figura 11 D, H, M).

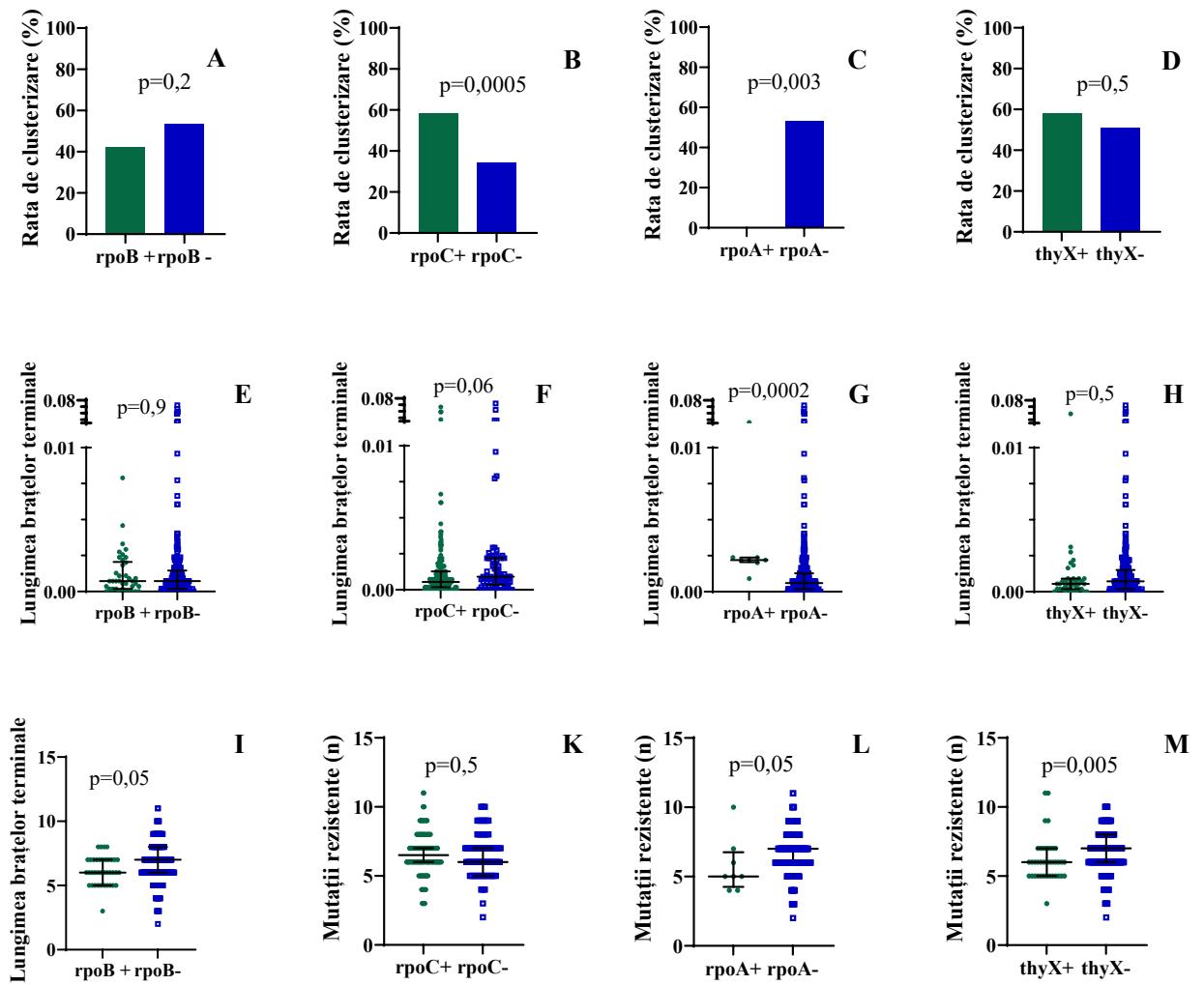


Figura 11. Mutații compensatorii și transmisibilitatea în întreaga cohortă de tulpini de *M. tuberculosis* complex

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 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 12 H, Figura 13 D).

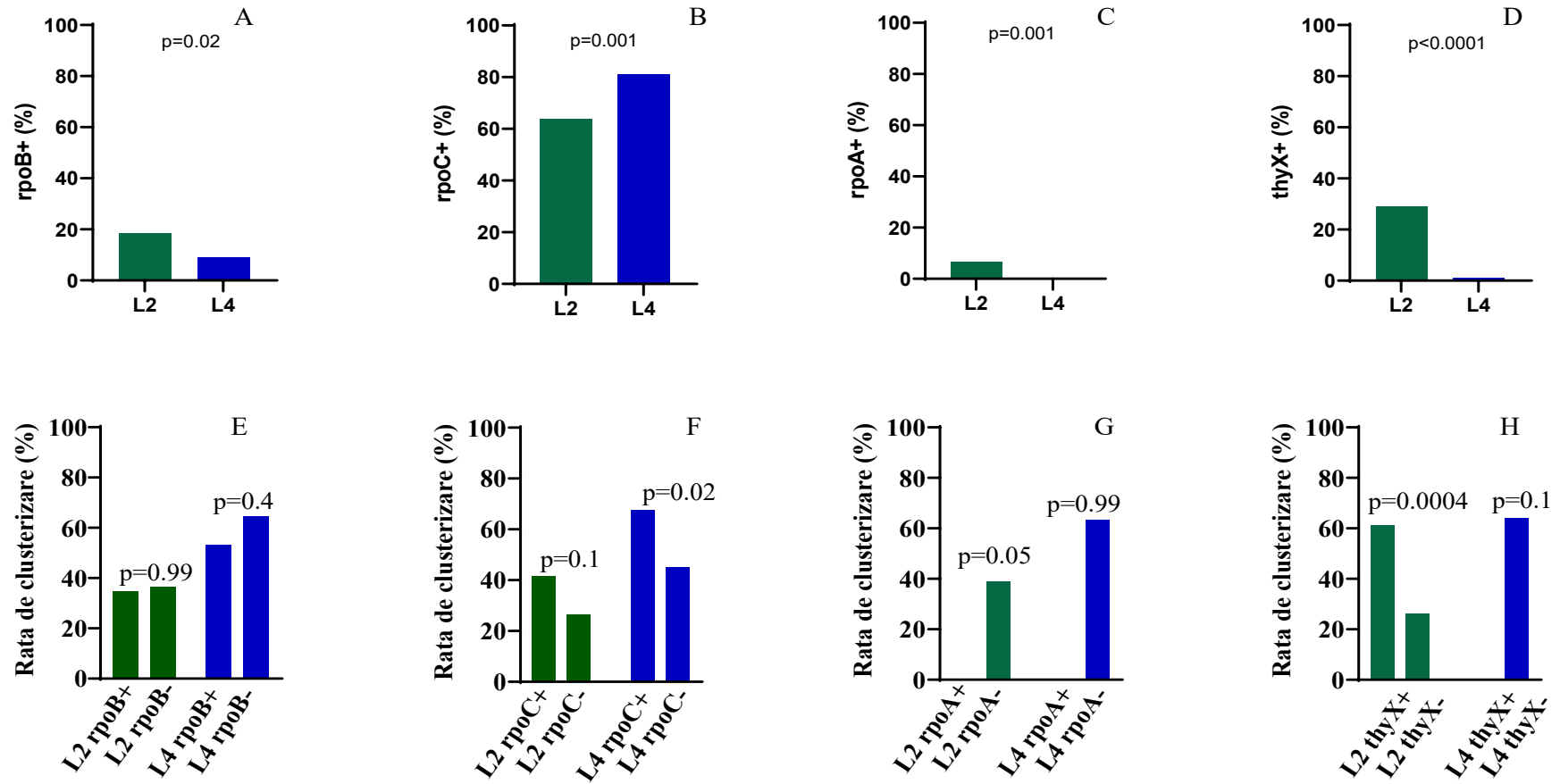


Figura 12. Mutații compensatorii și transmisibilitate în funcție de linia *M. tuberculosis complex*

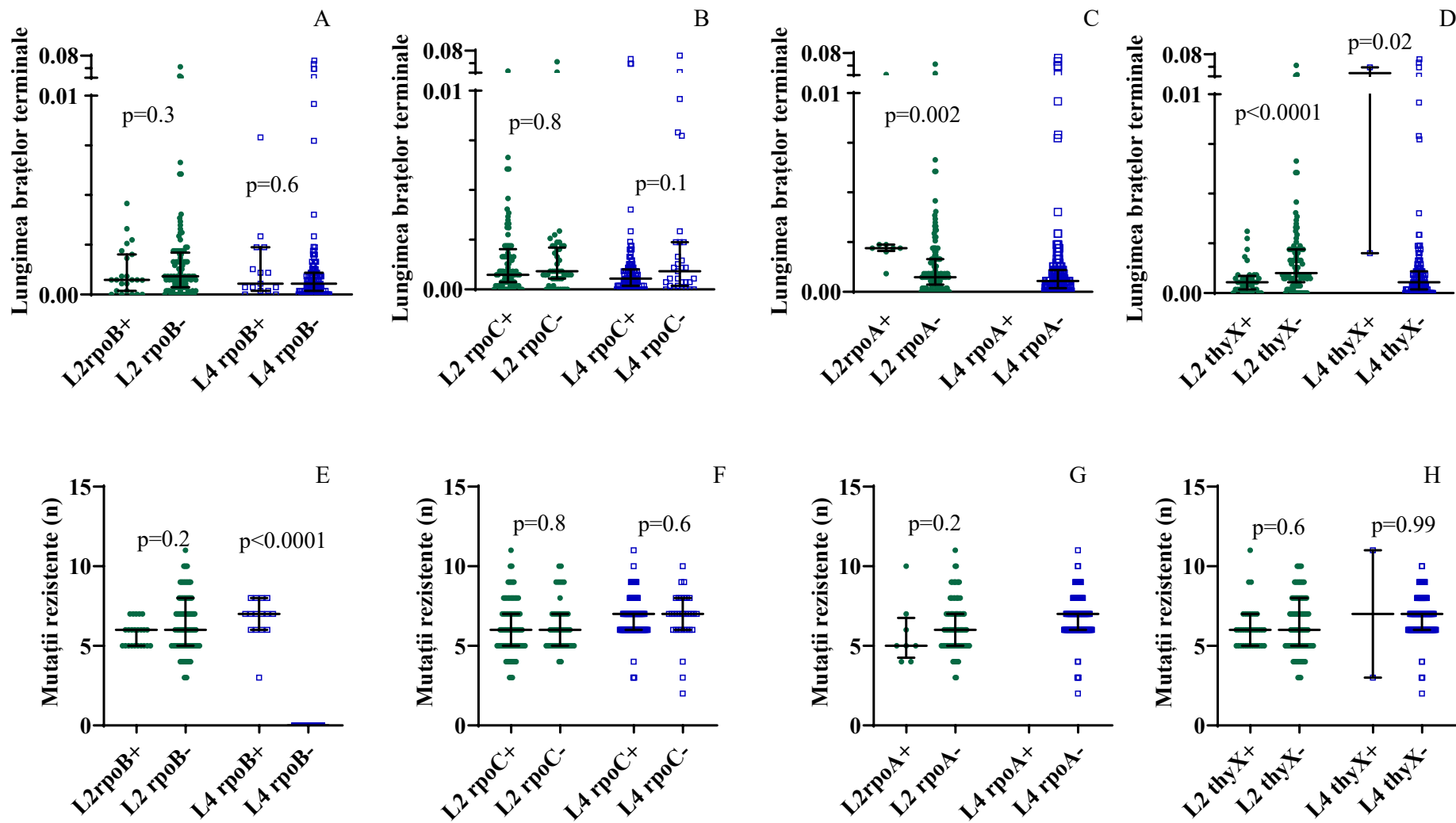


Figura 13. Caracteristici filogenetice ale transmisibilității și rezistenței antimicrobiene în dependență de prezența mutațiilor compensatorii și de linia *M. tuberculosis complex*

Homoplazia și posibilă selecție pozitivă

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 fie mutații cu codoni sinonimi, fie 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 genoame analizate, de la 2 până la 285 de tulpini dintre cele 288 analizate, rezultând într-un număr total de 2624 de alele homoplazice în întreaga cohortă (Anexa 2). Cincizeci și trei (75,7 %) dintre aceste SNP-uri (1822 de alele; 69,4 %) au apărut 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 la izoniazidă (katG, fabG1), rifampicină (rpoB), moxifloxacină (gyrA, gyrB), kanamicină (eis, whiB7), D-cicloserină (alr), izoniazidă, etionamidă și protionamidă (fabG1), etambutol (embA, embB, ubiA), PAS (folC, Rv2670), streptomycină (rpsL, whiB7), delamanid (fbiC) 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) (Tabel 2, Figura 11).

De asemenea, au fost observate mutații în prpR (Rv1129c I433T și H355R), ce reprezintă o genă asociată cu toleranța la medicamente [111], 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 [IÎC 8-10] vs 9 [IÎC 9-10], $p < 0,9$, respectiv).

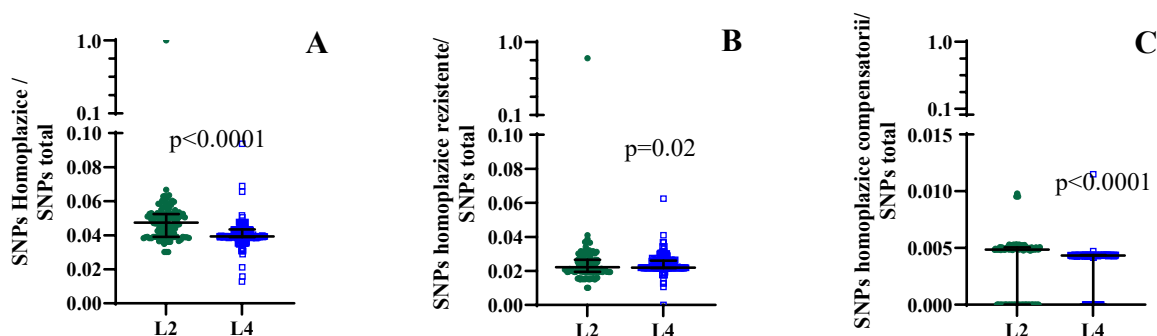


Figura 14. Homoplazie și selecție pozitivă putativă în funcție de linia *M. tuberculosis complex*

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 [IÎC 0,038 - 0,043] în comparație cu izolatele L4 (0,047 [IÎC 0,039 - 0,052]) (Figura 14 A). Această diferență se observă, de asemenea, la compararea SNP-urilor 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 14 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 [111], a fost găsită aproape exclusiv în rândul izolatelor L2 (98% în L2 față de 1,2% în L4, $p < 0,0001$).

Tabel 2. **Homoplazia în genele implicate în rezistența la medicamente și evoluția compensatorie**

Poziția genom	Gena	Mutația	Medicament	Indice consistență	Prevalență	L2	L4	p
1673425	fabG1	-15c>t	H, Eth	0,125	164	14 (11,3)	150 (91,5)	<0,0001
2715342	eis	-10g>a	Km	0,167	8	6 (4,8)	2 (1,2)	0,0790
2715344	eis	-12c>t	Km	0,143	149	7 (5,6)	142 (86,6)	<0,0001
2715346	eis	-14c>t	Km, Am	0,5	13	13 (10,5)	0	<0,0001
2715369	eis	-37g>t	Km	0,5	3	3 (2,4)	0	0,08
2747151	folC	S150G (agc/Ggc)	PAS	0,5	3	3 (2,4)	0	0,08
2747471	folC	I43T (atc/aCc)	PAS	0,5	2	2 (1,6)	0	0,2
2747480	folC	E40G (gag/gGg)	PAS	0,5	2	2 (1,6)	0	0,2
2986827	Rv2670c	A5V (gca/gTa)	PAS	0,2	16	3 (2,4)	13 (7,9)	0,07
3840391	alr	D344N (gac/Aac)	Cs	0,5	3	0	3 (1,8)	0,3
3840393	alr	M343T (atg/aCg)	Cs	0,5	2	2 (1,6)	0	0,2
4243217	embA	-16c>t; -16c>a; -16c>6	E	0,375	28	4 (3,2)	24 (14,6)	0,001
4243221	embA	-12c>t	E	0,143	12	9 (7,3)	3 (1,8)	0,03
764817	rpoC	V483G (gtg/gGg)/V483A (gtg/gCg)	Compensază rpoB	0,154	134	15 (12,1)	119 (72,6)	<0,0001
764840	rpoC	I491V (atc/Gtc)		0,143	21	20 (16,1)	1 (0,6)	<0,0001
764916	rpoC	L516P (ctg/cCg)		0,333	3	3 (2,4)	0	0,08
3877960	rpoA	V183A (gtc/gCc)		0,5	2	2 (1,6)	0	0,2
3067961	thyX	-16c>t	Compensază ThyA	0,5	36	26 (21,0)	0	<0,0001
3135912	Rv2828c	T141R	Asociată patologiei pulmonare	0,5	122	121 (97,6)	1 (0,6)	<0,0001

2.4 Asocieri dintre determinantele genotipice cu impact asupra rezistenței la antimicrobiene a MTB și evoluției clinice a tuberculozei

În cadrul studiului au fost evaluate potențiale asocieri dintre linia genotipică a *M. tuberculosis complex* și caracteristicile clinice a bolii tuberculoase la bolnavii de la care au fost izolate tulpinile respective (Tabel 3).

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 (Tabel 3).

Tabel 3. Caracteristicile clinice și rezultatele tratamentului conform liniilor genotipice ale *M. tuberculosis complex*

	Total (n=288)	L2 (n=124)	L4 (n=164)	p
Bărbați	228 (79,2%)	96 (77,4%)	132 (80,5%)	0,6
Vârsta, mediana [IÎC]	33 [IÎC 42-53]	43,5 [IÎC 31,2-53,7]	42 (IÎC: 33-53)	0,8
HIV pozitiv (n=269)	20 (7,4%)	11 (9,6%)	9 (5,8%)	0,3
Diabet (n=118)	10 (8,5%)	7 (5,9%)	3 (1,9%)	0,1
Tipul cazului TB				
Cazuri noi	170 (59,0%)	76 (61,3%)	94 (57,3%)	0,6
Retratament după recidivă	68 (23,6%)	24 (19,3%)	44 (26,8%)	0,2
Retratament după eșec	33 (11,5%)	10 (5,8%)	7 (4,3%)	0,2
Retratament după pierderea din supraveghere	17 (5,9%)	14 (11,3%)	19 (11,6%)	1,0
Leziuni cavitare la radiografie (n=275)	142 (51,6%)	69 (59%)	73 (46,2%)	0,04
Nr. de medicamente active	5 [IÎC 4-5]	4 [IÎC 3-5]	5 [IÎC 4-5]	0,02
Rezultate tratament (n=272)				
Vindecat	141 (51,8%)	54 (46,6%)	87 (55,8%)	0,1
Tratament încheiat	12 (4,4%)	5 (4,3%)	7 (4,5%)	1,0
Eșec	21 (7,7%)	15 (12,9%)	6 (3,9%)	0,01
Pierdut din supraveghere	53 (19,5%)	22 (19%)	31 (19,9%)	0,9
Deces	45 (16,5%)	20 (17,2%)	25 (16,0%)	0,9

IÎC=intervalul între cuartile

Pentru a evalua 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 (Tabel 4). 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.

Tabel 4. Caracteristicile pacienților cu TB MDR tratați în Republica Moldova în perioada 2013-2018

	Pacienți TB MDR în Moldova, 2013-2018 neincluși în studiu (n=5608)	Pacienți TB MDR incluși în studiu (n=288)	p
Bărbați	4361 (77,7%)	229 (79,5%)	0,5
Vârsta, media± deviația standard	39,7±12,7	42,5±12,7	0,0002
HIV pozitiv	649 (11,9%)	20 (7,4%)	0,02
Diabet	141 (2,5%)	10 (3,5%)	0,3
Leziuni cavitare	3212 (57,3%)	142 (51,6%)	0,07
Istoricul TB			
Cazuri noi	2457 (43,8%)	170 (59,3%)	<0,0001
Episod anterior de TB - recidivă	1267 (22,6%)	68 (23,6%)	0,7
Episod anterior de TB - eșec	1016 (18,1%)	17 (5,9%)	<0,0001
Episod anterior de TB - pierdut din supraveghere	868 (15,5%)	33 (11,5%)	0,6

Comparând caracteristicile clinico-demografice ale bolnavilor cu diferite linii genotipice ale *M. tuberculosis complex* (L2 sau L4) în regresia univariată, nu au fost observate diferențe dintre acestea după variabilele ca: vârsta, sexul, statutul HIV, diabetul zaharat, episoadele anterioare de TB ($p > 0,05$). La fel, nu au fost diferențe în rata mutațiilor compensatorii ($p=0,072$). Cu toate acestea, cazurile de boală provocate de linia genotipică L2 au fost caracterizate de o probabilitate mai mare a leziunilor cavitare (OR = 1.67, 95% CI 1.03-2.71, $p=0.04$) și o rată mai mare de eșec al tratamentului (OR 4.03 95% CI 1.47-11.01, $p=0.007$), aceasta în condițiile unui număr mai mic de medicamente antituberculoase cu susceptibilitate demonstrată în schema inițială de tratament 4 (ÎÎC 3-5) versus 5 (ÎÎC 3-5) în L4 și L5, respectiv (Tabel 5).

Tabel 5. Asocieri ale mutațiilor implicate în rezistența la medicamente și caracteristicile clinice cu linia genotipică de *Mycobacterium tuberculosis complex*

Variabila dependentă						Regresie logistică univariată		
Variabila independentă	Linia 2 (n=124)	%	Linia 4 (n=164)	%	OR	95% CI inferior	95% CI superior	P
Sexul								
Feminin	28	22,6	32	19,5	REF			
Masculin	96	77,4	132	80,5	0,83	0,47	1,47	0,53
Vârsta								
<31	27	21,8	30	18,3	REF			

31-50	56	45,2	85	51,8	0,73	0,39	1,36	0,32
>50	41	33,1	49	29,9	0,93	0,48	1,81	0,83
Anul								
2013	26	21,0	26	15,9	REF			
2014	24	19,4	26	15,9	0,92	0,42	2,01	0,83
2015	14	11,3	29	17,7	0,48	0,21	1,12	0,09
2016	17	13,7	36	22,0	0,47	0,21	1,04	0,06
2017	19	15,3	25	15,2	0,76	0,34	1,70	0,51
2018	24	19,4	22	13,4	1,09	0,49	2,41	0,83
HIV								
Negativ	104	83,9	146	89,0	REF			
Pozitiv	11	8,9	9	5,5	1,72	0,69	4,23	0,25
n/a	9	7,3	9	5,5	1,40	0,54	3,66	0,49
Diabet								
Nu	111	89,5	155	94,5	REF			
Da	7	5,6	3	1,8	3,25	0,83	12,88	0,09
n/a	6	4,8	6	3,7	1,40	0,44	4,44	0,57
Tipul cazului								
Caz nou	76	61,3	94	57,3	REF			
Istoric TB- recidivă	24	19,4	44	26,8	0,67	0,38	1,21	0,19
Istoric TB- eșec	10	8,1	7	4,3	1,77	0,64	4,86	0,27
Istoric TB- pierdut din supraveghere	14	11,3	19	11,6	0,91	0,43	1,94	0,81
Cavități la începutul tratamentului								
Absente	48	38,7	85	51,8	REF			
Prezente	69	55,6	73	44,5	1,67	1,03	2,71	0,04
n/a	7	5,6	6	3,7	2,07	0,66	6,50	0,21
Nr. medicamente active * mediana [ÎC]	4 [3-5]		5[4-5]		0,82#	0,68	0,99	0,04
Rezultatul tratamentului								
vindecat	54	46,6	87	55,8	REF			
Încheiat	5	4,3	7	4,5	1,15	0,35	3,81	0,82
Eșec	15	12,9	6	3,9	4,03	1,47	11,01	0,007
Pierdut din supraveghere	22	19,0	31	19,9	1,14	0,60	2,18	0,68
Deces	20	17,2	25	16,0	1,29	0,65	2,54	0,46
n/a	8	6,5	8	4,9	1,61	0,57	4,55	0,37
Mutații compensatorii								
Absente	3	2,4	7	4,3	REF			
Prezente	121	97,6	157	95,7	1,15	0,53	2,49	0,72

Asocierea dintre linia genotipică micobacteriană și caracteristicile nefavorabile ale bolii tuberculoase (leziunile cavitare și eșecul tratamentului) a fost testată în cadrul unui model de regresie logistică univariată și consecutiv în cadrul unui model multivariat. În acest scop a fost asumată covariabilitatea dintre variabile precum, vârsta, sexul, statutul HIV, diabetul zaharat și

prezența mutațiilor compensatorii. La fel, datorită lipsei diferențelor semnificative dintre liniile genotipice după variabile precum numărul de medicamente cu sensibilitate demonstrată din schema inițială de tratament, rezistența la fluorochinolone și pirazinamidă ($p > 0,11$, în regresie logistică univariată) acestea nu au fost testate în modelul de regresie logistică pentru prezența leziunilor cavitare.

Tabel 6. Asocieri între parametrii clinici, linia genotipică a complexului *Mycobacterium tuberculosis complex*, mutațiile implicate în rezistența la medicamente și cele compensatorii cu rezultatele negative ale tratamentului antituberculos

Cazuri noi	Variabila dependentă				Regresie logistică multivariată			
Variabila independentă	Rezultat negativ (n=26)	%	Rezultat pozitiv (n=102)	%	OR ajustat	95% CI inferior	95% CI superior	p ajustat
Linia								
L4	11	42,3	58	56,9	REF			
L2	15	57,7	44	43,1	1,64	0,49	5,51	0,43
Sexul								
Feminin	4	15,4	22	21,6	REF			
Masculin	21	80,8	80	78,4	1,72	0,31	9,60	0,54
Vârsta, mediana (ÎC)	47,5 (39-56)		40,5 (31-51)		1,06#	1,00	1,11	0,04
HIV								
Negativ	19	73,1	96	94,1	REF			
Pozitiv	5	19,2	4	3,9	8,19	1,34	49,80	0,02
n/a	0	0	2	2,0	NA	NA	NA	NA
Diabet								
Absent	25	96,2	97	95	REF			
Prezent	1	3,8	5	4,9	0,64	0,06	7,01	0,71
Leziuni cavitare								
Absente	10	38,5	56	54,9	REF			
Prezente	16	61,5	46	45,1	1,26	0,40	3,93	0,69
Nr. medicamente active în schema inițială*, mediana [ÎC]	4 (3-5)		5 (4-5)		0,56#	0,31	1,02	0,06
Fluoroquinolone*								
Susceptibil	22	84,6	89	87,3	REF			
Rezistent	4	15,4	13	12,7	0,90	0,19	4,26	0,89
Pyrazinamid*								
Susceptibil	11	42,3	62	60,8	REF			
Rezistent	15	57,7	40	39,2	0,91	0,22	3,75	0,90
Mutații compensatorii								
Absente	3	11,5	13	12,7	REF			
Prezente	23	88,5	89	87,3	4,84	0,58	40,15	0,14

Rezultatele negative includ eșecul tratamentului și decesul. Rezultatele pozitive includ vindecarea și tratamentul finalizat (excluzând cazurile pierdute din urmărire). #pe unitate de creștere; *conform profilului de rezistență genotipică la medicamente.

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) (Tabel 6).

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) (Tabel 7).

Tabel 7. Asocieri între parametrii clinici, linia *Mycobacterium tuberculosis complex* și mutațiile implicate în rezistența la medicamente și efectele compensatorii cu boala cavitară la începutul tratamentului, în rândul cazurilor noi

Cazuri Noi	Variabila dependentă				Regresie logistică multivariată				
	Variabilele independente	Leziuni cavitare prezente (n=66)	%	Leziuni cavitare absente (n=73)	%	OR ajustat	95% CI inferior	95% CI superior	P ajustat
Linia									
L4	33	50,0	49	67,1	REF				
L2	33	50,0	24	32,9	2,20	1,07	4,55	0,03	
Sexul									
Feminin	12	18,2	18	24,7	REF				
Masculin	54	81,8	55	75,3	1,51	0,63	3,64	0,35	
Vârsta									
<31	11	16,7	20	27,4	REF				
31-50	37	56,1	39	53,4	1,55	0,62	3,80	0,34	
>50	18	27,3	14	19,2	1,64	0,55	4,87	0,37	
HIV									
Negativ	60	90,9	63	86,3	REF				
Pozitiv	5	7,6	8	11,0	0,76	0,22	2,61	0,65	
Necunoscut	1	1,5	2	2,7	NA	NA	NA	NA	
Diabet									
Absent	62	93,9	72	98,6	REF				
Prezent	4	6,1	1	1,4	3,27	0,34	31,72	0,31	
Mutații compensatorii									
Absente	5	7,6	10	13,7	REF				
Prezente	61	92,4	63	86,3	1,70	0,52	5,51	0,38	

2.4 Sinteza și interpretarea rezultatelor evaluării diversității genotipice a *Mycobacterium tuberculosis complex* în contextul dezvoltării rezistenței antibacteriene și prezentării clinice a bolii

În prezentul studiu retrospectiv de cohortă realizat pe tulpinile MDR ale *M. tuberculosis complex* circulante în Republica Moldova, am identificat diferențe în caracteristicile genetice ale tulpinilor de MTBC, asociate cu rezultatele nefavorabile ale tratamentului antituberculos și cu o transmisibilitate crescută. În timp ce tulpinile L4 (Ural) prezentau mai multe mutații asociate cu rezistența și o transmitere potențial mai recentă, tulpinile L2 au fost asociate cu boala cavitară și cu un potențial factor genetic de risc sporit pentru o patologie pulmonară mai severă.

Studiile anterioare au evidențiat deja structura unică a populației bacteriene a tulpinilor MTBC MDR din Republica Moldova, care este dominată doar de câteva grupuri L2, precum și de expansiunea clonală a tulpinilor L4/Ural [8,9]. În special, subtipurul L4/Ural și istoria sa evolutivă pare a fi relativ tânără, cu un strămoș comun datând din anii 1990 și o expansiune masivă a dimensiunii populației la începutul anilor 2000 [9]. O posibilă explicație pentru acest succes epidemiologic al tulpinilor L4/Ural ar putea fi numărul mare de mutații rezistente, în medie au fost identificate șapte mutații per tulpină, ceea ce probabil complică diagnosticul și tratamentul cazurilor de boală determinate de aceste tulpini. În comparație cu tulpinile MDR de linia L2, tulpinilor L4/Ural au o transmisibilitate mai ridicată, aceasta poate fi, de asemenea, determinată de manifestarea incipientă și subclinică a tuberculozei, așa cum s-a sugerat anterior [162]. Altfel spus, ar putea fi, că pacienții cu aceste tulpini să răspândească infecția micobacteriană (prin bacterii active metabolic dar nedetectate) cu sau fără de leziuni radiografice, dar să nu prezinte întregul spectru de simptome și semne clinice ale tuberculozei active [162]. Într-un astfel de scenariu, pacienții infectați cu o tulpină MDR L4 (Ural) ar fi diagnosticați prea târziu din cauza absenței simptomelor clare de tuberculoză sau ar putea fi externați prea devreme din cauza conversiei aparente a culturii la timp (dar păstrarea de facto a contagiozității).

Într-un context geografic mai larg, tulpinile MTBC MDR ce aparțin liniei L2 din Republica Moldova au, de asemenea, o transmisibilitate deosebit de înaltă. În studiile anterioare, au fost identificate tulpini L2 din "focarul din Asia Centrală" și "focarul european/rus W148" în diferite zone geografice din Asia Centrală, Europa de Est și Federația Rusă [149,163]. Originea acestor populații micobacteriene datează din anii 1960, iar evoluția rezistenței la medicamente a acestor tulpini a fost probabil influențată de deficiențele fostului sistem de sănătate sovietic și de absența definițiilor și ghidurilor pentru managementul clinic al TB MDR înainte de anii 1990 [164,165]. Mai mult, tulpinile L2 au fost asociate cu eșecul tratamentului și recidiva bolii [162]. O explicație pentru o rată mai sporită a rezultatelor nefavorabile ale tratamentului antituberculos în cazul infecției cu tulpini L2 (MDR) ar putea fi o patologie pulmonară crescută [166–168]. În acest sens, Grandjean et al. au asociat mutația Rv2828c T141R cu o patologie radiologică mai extinsă la pacienții din Lima, Peru, prezentă în special la tulpinile L4. Recent, aceeași mutație a fost, de asemenea, detectată într-o zonă cu incidență ridicată a tuberculozei M/XDR-TB în Mumbai, India, și la tulpinile L2 [169]. Proteina ipotetică Rv2828c face parte dintr-un sistem de toxine-antitoxine și s-a constatat frecvența crescută a acesteia și la tulpinile L2 rezistente la medicamente din Africa de Sud. De asemenea, Farhat et al. au arătat că gena Rv2828c este supusă unei selecții pozitive într-un set larg de MTBC din diverse zone geografice. În studiul realizat mutația Rv2828c T141R a fost identificată aproape exclusiv și cu o frecvență mare la tulpinile L2, ceea ce ar putea explica

de ce pacienții cu TB MDR infectați cu o tulpină L2 au o probabilitate mai mare de a avea leziuni imagistice cavitare și eșec al tratamentului în Republica Moldova [10].

În studiul prezent, frecvența mutațiilor compensatorii a fost mai înaltă printre tulpinile L2 MDR, în același timp, tulpinile din expansiunea clonală observată în cazul L4.2.1 (Ural) prezintă, de asemenea, mutația compensatorie rpoC V483G, care ar putea fi un alt factor ce contribuie la succesul epidemiologic și la transmisibilitatea acestei sublinii de L4.

Sunt cunoscute mai multe studii care sugerează asocierea dintre caracteristicile genetice ale tulpinilor de MTBC și particularitățile clinice ale bolii tuberculoase. Unele dintre ele au furnizat dovezi că variabilitatea genetică a MTBC influențează virulența și imunogenitatea, care, la rândul lor, afectează rezultatele tratamentului și evoluția bolii [86,170,171]. Cu toate acestea, sunt necesare mai multe eforturi pentru a explica interacțiunile gazdă-patogen și asocierea lor cu datele clinice.

Limitările acestui studiu sunt reprezentate de designul retrospectiv și de lipsa în analiza efectuată a izolatelor *M. tuberculosis complex* sensibile la medicamente. Trebuie admise și limitele implicite date de utilizarea drept markeri ai transmiterii recente a distanței genetice și a lungimii brațelor terminale care pot fi influențate de rata mutațiilor ridicată/redușă sau timpul de latență diferit ale anumitor sublinii micobacteriene.

2.5 Concluzii la capitolul 2

1. Tulpinile MDR de *Mycobacterium tuberculosis complex* din Republica Moldova aparțin în principal genotipurilor L2 și L4, iar proporția lor este stabilă pe parcursul perioadei de studiu;
2. Există diferențe semnificative în ceea ce privește rezistența la preparatele antituberculoase între liniile L2 și L4 de MTBC;
3. Rezistența față de anumite medicamente pentru tuberculoză este determinată de diferite mutații în L2 și L4;
4. Boala tuberculoasă are caracteristici clinice mai severe (frecvență mai mare a leziunilor cavitare și eșecuri) în cazurile cauzate de tulpinile L2 potențial favorizate și de selecția pozitivă a mutațiilor Rv2828c T141R;
5. Linia genotipică L4 are o rată mai mare de rezistență și de transmitere, care ar putea fi favorizată de prezența mutațiilor compensatorii.

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

Tuberculoza multidrog-rezistentă (TB MDR), reprezintă o provocare majoră în calea eliminării tuberculozei la scară mondială, în cazul formelor MDR înregistrându-se o rată cu mult mai mare a eșecurilor terapiei antituberculoase. În țările cu povară înaltă a tuberculozei din Europa de Est, TB MDR înregistrează o incidență deosebit de mare cu repercusiuni semnificative asupra reducerii poverii socio-medicale a acestei boli [147].

Dobândirea rezistenței *Mycobacterium tuberculosis* la preparatele antituberculoase determină căutarea de noi medicamente eficiente, împotriva tuberculozei MDR și a tuberculozei cu rezistență extinsă la medicamente (XDR) [172]. În 2012, Food and Drug Administration a aprobat utilizarea fumaratului de bedaquilină ca parte a terapiei combinate pentru TB MDR [173]. Noul medicament anti-TB, bedaquilina, a stârnit mari așteptări, în reducerea ratei de deces și de eșec precum și scurtarea duratei de tratament în TB MDR [119]. În anul 2019 pe baza rezultatelor unei meta-analize multinaționale, Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a acordat prioritate în tratamentul TB MDR fluorochinolonelor, bedaquilinei și linezolidului (toate clasificate ca agenți din grupul A). Astfel, la ora actuală bedaquilina se numără printre medicamentele antituberculoase de primă intenție pentru tratamentul pacienților cu TB MDR. În Republica Moldova, bedaquilina a început a fi utilizată din septembrie 2016.

Studiile recente s-au concentrat pe identificarea țințelor genetice asociate cu rezistența la bedaquilină. Au fost descriși mai mulți loci genetici asociați cu rezistența la bedaquilină, la fel, existând date care demonstrează posibilitatea unei rezistențe la bedaquilină preexistente anterior introducerii medicamentului [174]. Mutațiile în gena *atpE*, care codifică subunitatea C oligomerică transmembranară a ATP-sintetazei, sunt legate biologic de rezistența la bedaquilină în vitro [175]. Mutațiile într-un regulator transcripțional (*Rv0678*) al genelor care codifică inhibitorul pompei de eflux *MmpS5-MmpL5* generează o rezistență de nivel scăzut la bedaquilină și determină rezistență încrucișată atât la bedaquilină, cât și la clofazimină [176,177]. Mutațiile în *Rv0678* reprezintă principalul mecanism de rezistență la CFZ, însă prevalența tulpinilor rezistente la clofazimină și a mutațiilor în *Rv0678* în izolatele clinice de MTBC rămâne necunoscută [178,179]. Au fost descrise în vitro, mutațiile în gena *pepQ* (prolin-aminopeptidazei - *Rv3525c*) care conferă rezistență încrucișată de nivel scăzut între bedaquilină și clofazimină [180,181], dar care încă nu a fost descrisă în rândul izolatelor clinice [178]. Mutațiile în *Rv0678* par a fi principalul mecanism care conferă rezistență, asociate cu concentrații minime inhibitorii (CMI) variabile.

În prezenta lucrare a fost realizat un studiu 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 cu rezistență la 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.

3.1 Material și metode

Selecția tulpinilor *M. tuberculosis complex* incluse în studiu

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 stocată cel puțin un izolat de *M. tuberculosis complex* din sputa colectată anterior inițierii tratamentului pentru episodul respectiv de boală. Informația despre rezultatele testelor fenotipice de sensibilitate la medicamentele antituberculoase (TSM) efectuate de rutină, cât și datele demografice și clinice, inclusiv regimurile terapeutice și rezultatele tratamentului au fost extrase din Sistemul informațional de monitorizare și evaluare a tuberculozei (SIME-TB) din Republica Moldova.

Au fost analizate tulpini clinice de *M. tuberculosis complex* izolate de la 82 de pacienți cu TB MDR, colectate în biobanca LNR din Chișinău, Republica Moldova. Tulpinile *M. tuberculosis complex* au fost izolate de la pacienți înainte de începerea tratamentului cu bedaquilină și/sau după inițierea regimului de tratament cu bedaquilină în Republica Moldova în perioada septembrie 2016 - iunie 2018. Din cauza contaminării sau a lipsei de creștere au fost excluse 11 probe, astfel în analiza finală au fost incluse 97 de izolate *M. tuberculosis complex* izolate de la 71 de pacienți (Figura 15).

Testarea fenotipică a sensibilității antimicrobiene

Pe lângă informația despre rezultatele testelor fenotipice de sensibilitate la medicamentele efectuate de rutină extrase din SIME-TB, pentru toate izolatele incluse în studiu a fost realizată testarea fenotipică a sensibilității antimicrobiene pentru preparatele antituberculoase adiționale bedaquilina și clofazimina. A fost determinată creșterea la 0,5 mg/L, 1,0 mg/L (corespunzător concentrației critice OMS) și 2,0 mg/L de bedaquilină, și clofazimină, utilizând sistemul BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, SUA). În acest scop culturile pe mediul Lowenstein-Jensen, omogenizate în 4,5 ml de apă sterilă și ajustate la standardul McFarland 1,0 prin măsurarea densității optice, au fost transferate și cultivate în MGIT960 în conformitate cu instrucțiunile producătorului (BD Microbiology systems, SUA). Puritatea culturii MGIT a fost

verificată prin colorația Ziehl-Neelsen și prin testul rapid cu antigen MPT64 (BD Microbiology systems, SUA). După incubare, un tub MGIT pozitiv a fost utilizat pentru TSM până în a cincea zi inclusiv. Un mililitru de suspensie de cultură a fost transferat într-un recipient cu 4,0 ml de soluție salină sterilă. Jumătate de mililitru în diluție 1:5 din cultura de testare a fost utilizat pentru inoculare în tuburile care conțineau medicament anti-TB de 0,5 ori, 1 ori și 2 ori mai mare decât concentrația critică actuală de bedaquilină și clofazimină, adică 1mg/L (recomandată de OMS). Controlul creșterii în mediu fără medicament a fost inoculat în diluția 1:500. Rezultatele TSM au fost determinate în momentul în care tubul de control al creșterii prezenta >400 de unități de creștere (UC) între ziua 4 și ziua 13. Interpretarea rezultatelor TSM a fost următoarea: nicio creștere în flaconul cu medicament - "sensibil", 1-399 UC - "intermediar" și >400 UC "rezistent".

Testele de sensibilitate fenotipică au fost efectuate în conformitate cu procedurile standard de operare pentru TSM pentru medicamentele de linia a doua, utilizând sistemul BACTEC MGIT 960. Tulpinile au fost cultivate în mediu lichid (MGIT) pentru pregătirea inoculului TSM. Pentru fiecare izolat, medicamentele au fost testate la trei concentrații (Tabel 8).

Tabel 8. Concentrațiile de medicamente testate

	Concentrație joasă	Concentrație critică	Concentrație înaltă
Bedaquilină	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml
Clofazimină	0.5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml

Testele de sensibilitate antimicrobiană pentru alte antibiotice, rezultatele cărora au fost extrase din SIME-TB, au fost efectuate în sistemul MGIT960, utilizând concentrațiile critice recomandate de OMS în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Becton Dickinson, SUA) și conform instrucțiunilor din ghidurile OMS [1]

Extragerea ADN-lui genomic a tulpinilor de MTBC MDR

Izolatele clinice de *M. tuberculosis complex* au fost supuse extracției de ADN genomic în Laboratorul Național de Referință pentru Tuberculoză din Chișinău, Republica Moldova. Probele păstrate la -80°C au fost prelucrate și cultivate pe medii solide folosind metode standard.

Tulpinile *M. tuberculosis complex* au fost inoculate pe mediul Löwenstein Jensen la 37°C, până când creșterea a fost clar vizibilă. Coloniile au fost transferate într-un tub de microcentrifugare (2,0 ml) care conținea 400 µl de tampon TE și au fost încălzite timp de 20 de minute la 80 °C pentru a distruge bacteriile. După 3 min de centrifugare la 13 000 r, a fost eliminat supernatantul și au fost adăugate 400 µl de soluție tampon TE, urmat de o agitare în vortex pentru a separa celulele. S-au adăugat apoi 50 µl de lizozim (10 mg/ml), ulterior s-a vortexat și incubat soluția peste noapte la 37 °C. A doua zi, s-a adăugat 70 µl de SDS 10 %, 5 µl de proteinază K (10

mg/ml), s-a vortexat ușor și incubat soluția 10 minute la 65 °C. Ulterior, au fost adăugate 100 μl de NaCl 5M, 100 μl de CTAB/NaCl (preîncălzit la 65 °C), urmat de vortexare și incubare timp de 10 min la 65 °C. Apoi au fost adăugate 750 μl de amestec de cloroform/izoamiloalcool (24:1), a fost inversat tubul de câteva ori și centrifugat la temperatura camerei timp de 15 min la 13 000 r. Supernatantul apos a fost transferat cu grijă într-un nou tub de microcentrifugare și s-a adăugat 0,6 volum de izopropanol pentru a precipita acizii nucleici timp de 30 min la -20 °C (sau mai mult).

Apoi s-a centrifugat timp de 10 minute la temperatura camerei la 13 000 r, a fost înlăturat supernatantul și spălat ADN-ul în 0,5 ml de etanol 75 % rece, inversând tubul de câteva ori, urmat de o centrifugare de 5 minute la temperatura camerei și s-a înlăturat cu precauție supernatantul. Stratul de ADN a fost uscat la 60 °C timp de aproximativ 10 minute, iar ADN-ul a fost dizolvat în cele din urmă în 100 μl de tampon TE la 37 °C timp de 30 de minute sau la temperatura camerei până când ADN-ul a fost complet dizolvat.

Secvențierea întregului genom micobacterian

ADN-ul extras din 97 de izolate de *M. tuberculosis complex* obținute de la 71 de pacienți cu TB MDR care au administrat în regimul de tratament bedaquilină, a fost supus secvențierii întregului genom (WGS) la Centrul de Cercetări Borstel, Germania. Probele de ADN au fost cuantificate, supuse unor măsuri de control al calității și vizualizate cu ajutorul unui fluorimetru Qubit și al unui gel de electroforeză pe agaroză.

Secvențierea a fost realizată cu o acoperire medie minimă a genomului de 50x, folosind librării de ADN împerecheate și tehnologia Illumina (Nextera-Xt și NextSeq500). Librăriile de secvențiere perechi au fost construite cu dimensiuni de inserție de aproximativ 300 pb, utilizând kituri standard de la Illumina în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Illumina, SUA) [36]. Fișierele Fastq (date brute de secvențiere) au fost trimise la European Nucleotide Archive și au fost cartografiate pe genomul de referință *M. tuberculosis complex* H37Rv (ID GenBank: NC_000962.3) utilizând pipeline MTBseq [157]. Au fost luate în considerare mutațiile (polimorfisme de un singur nucleotid (SNP), inserții și deleții) în 92 de gene implicate în rezistența la medicamente și acoperite de cel puțin o citire în ambele direcții a catenelor de ADN și o citire care să numească alela cu cel puțin un scor phred de 20. Predicția rezistenței genotipice a fost realizată pe baza unui catalog de mutații de la Centrul de cercetări Borstel, Germania, pe baza informațiilor disponibile la data de 3 iulie, 2020. Pe baza rezultatelor WGS, au fost clasificate izolatele de *M. tuberculosis complex* ca fiind extrem de rezistente la medicamente – XDR (MDR plus rezistență suplimentară față de orice fluorochinolonă și cel puțin un medicament injectabil), în conformitate cu clasificarea OMS până la 12/2020, și pre-XDR (adică MDR plus rezistență suplimentară față de orice fluorochinolonă sau cel puțin un medicament injectabil). Au fost luate în considerare variantele care au fost acoperite de cel puțin patru lecturi pe ambele direcții de citire

a catenelor de ADN, patru lecturi care indică alela cu cel puțin un scor phred de 20 și o frecvență a alelei de 75%.

Tratamentul tuberculozei rezistente la rifampicină în Republica Moldova (2016-2018)

Pe parcursul studiului, tratamentul pacienților cu tuberculoză MDR în Republica Moldova a fost oferit în conformitate cu Protocolul național de tratament al tuberculozei, în conformitate cu recomandările OMS pentru tratamentul tuberculozei MDR [156]. Conform acestuia toți pacienții au început inițial cu un regim standardizat de cinci medicamente TB de linia a doua, inclusiv o flurochinolonă (levofloxacină sau moxifloxacină), un injectabil de linia a doua (capreomicină sau amikacină), etionamidă, cicloserină și pirazinamidă. Regimul standardizat a fost apoi ajustat, atunci când a fost necesar, odată ce rezultatele testelor fenotipice de sensibilitate la medicamente au devenit disponibile. Durata tratamentului a fost ghidată de momentul conversiei culturii și a inclus o fază intensivă inițială de 6-8 luni, urmată de o fază de continuare cu o durată de 12-16 luni.

Metode de analiză statistică

Pacienții cu izolate secvențiate și rezultate ale tratamentului au fost împărțiți în două grupuri: rezultate pozitive ale tratamentului (considerat vindecat, adică niciun semn de recidivă a bolii (clinic sau microbiologic) până la 6 luni de la terminarea tratamentului) și rezultate negative ale tratamentului (inclusiv decesul cauzat de TB sau de alte cauze și eșecul tratamentului, adică nicio cultură negativă în termen de 8 luni de la tratament). În aceste grupuri au fost analizați următorii predictorii pentru rezultatul negativ al tratamentului: linia *M. tuberculosis complex*, sexul, clasificarea cazurilor (caz nou și tratat anterior), XDR (adică MDR cu rezistență suplimentară la o fluorochinolonă și la un medicament injectabil de linia a doua; clasificarea OMS până în 12/2020), prezența cavitațiilor, statutul HIV, vârsta și numărul de medicamente cu rezistență confirmată la începutul tratamentului care au fost incluse în regimul bazat pe bedaquilină. Pentru analiza comparativă a fost aplicat testul exact al lui Fisher și s-a calculat raportul șanselor (Odds Ratios - OR) prin tabelele de contingență 2x2. Pentru tabelele de contingență cu valoarea zero pentru cel puțin una dintre celule, am utilizat corecția Haldane-Anscombe prin adăugarea a 0,5 la fiecare celulă. Pentru a compara predictorii cu variabile continue, adică vârsta și numărul de medicamente inactive, am utilizat analiza de regresie logistică. Diferența dintre numărul de medicamente inactive între pacienții cu rezultate pozitive și negative ale tratamentului, precum și vârsta pacienților au fost comparate cu testul Mann-Whitney-U, deoarece nu am observat o distribuție normală ($p < 0,001$, testul de normalitate Shapiro-Wilk). Comparațiile perechi ale caracteristicilor pacienților (pacienți incluși vs. pacienți excluși) au fost efectuate cu testul exact al lui Fischer.

Considerații etice

Protocolul studiului a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al Universității

de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” nr. 49 din 12.04.2018 și Consiliul de evaluare instituțională al Institutului de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc", Chișinău, Republica Moldova (Nr.1/07.2019). Studiul nu a inclus intervenții fizice asupra pacienților, iar toate informațiile colectate au fost anonimizate la sursă.

3.2 Rezultatele aprecierii rezistenței genotipice și fenotipice la bedaquilină

Caracteristica lotului de studiu

În perioada ianuarie 2016 - decembrie 2018, în Republica Moldova, au inițiat tratamentul TB MDR 2967 de pacienți, inclusiv 1413 cazuri noi și 1554 cazuri de retratament.

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 (Figura 15). Dintre aceștia, în prezentul studiu au fost incluși cei care au avut cel puțin un izolat de *M. tuberculosis complex* din perioada de referință stocat în biobanca Laboratorului Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei. Astfel, în scopul studiului au fost identificate tulpini de *M. tuberculosis complex* de la 82/203 (40,4%) de pacienți. 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 perioadă 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 (ÎÎC) 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 ($p > 0,09$) (Tabel 9).

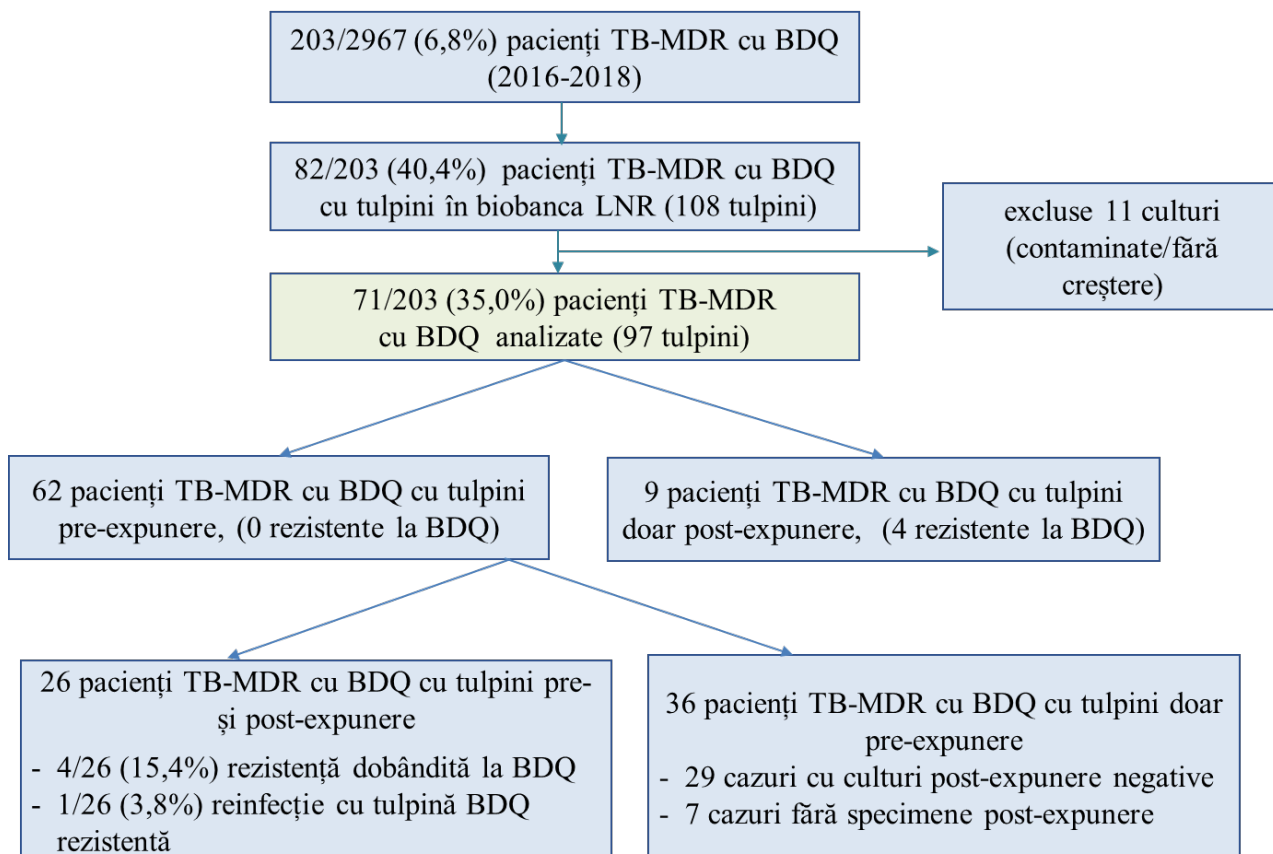


Figura 15. **Selectarea tulpinilor *M. tuberculosis* pentru determinarea rezistenței dobândite la bedaquilină**

Genotiparea în baza Whole Genome Sequencing (WGS) a izolatelor micobacteriene analizate a 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 medicamente 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

nicio 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 în care au constituit respectiv 27,0% și 8,2%, $p > 0,71$.

Tabel 9. Caracteristicile clinico-demografice ale pacienților incluși versus cei neincluși în studiu

Caracteristici	Toți pacienții cu BDQ 2016-2018 % (n)	Pacienți incluși % (n)	Pacienți excluși % (n)	p
Mediul urban	48,8 (99/203)	41,9 (26/62)	51,8 (73/141)	0,2
Genul masculin	75,9 (154/203)	80,6 (50/62)	73,8 (104/141)	0,4
Vârsta, mediana (ÎC)	37 (31-45)	39 (34-45)	36 (30-45)	0,09
Microscopie pozitivă	72,4 (147/203)	74,2 (46/62)	71,6 (101/141)	0,7
Tipul cazului de tuberculoză				
Cazuri noi	25,1 (51/203)	29,0 (18/62)	23,4 (33/141)	0,5
CTA-recidivă	14,8 (30/203)	12,9 (8/62)	15,6 (22/141)	0,7
CTA-pierdut din supraveghere	13,8 (28/203)	17,7 (11/62)	12,1 (17/141)	0,3
CTA-eșec	46,3 (94/203)	40,3 (25/62)	48,9 (69/141)	0,3
Rezultatele tratamentului				
În tratament la momentul încheierii studiului	6,9 (14/203)	6,5 (4/62)	7,1 (10/141)	1,0
pierdut din supraveghere	7,4 (15/203)	9,7 (6/62)	6,4 (9/141)	0,4
vindecat	66,7 (116/174)	71,2 (37/52)	64,8 (79/122)	0,5
eșec	25,9 (45/174)	23,1 (12/52)	27,0 (33/122)	0,7
deces	7,5 (13/174)	5,8 (3/52)	8,2 (10/122)	0,8
Statut HIV				
HIV pozitiv	12,7 (25/197)	12,9 (8/62)	12,6 (17/135)	1,0
HIV necunoscut	3,0 (6/203)	0,00 (0/62)	4,3 (6/141)	0,2

Caracteristicile tuturor pacienților care au primit un regim de tratament antituberculos ce conține bedaquilină (BDQ), în Republica Moldova (2016-2018). ÎC=interval între cuartile, CTA=caz tratat anterior.

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 (Tabel 10). Opt tulpini *M. tuberculosis complex* au avut o Concentrație Minimă Inhibitoare (CMI) a bedaquilinei 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) (Tabel 10; Figura 16).

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 izolate obținute după inițierea tratamentului anti TB MDR cu un regim terapeutic care includea bedaquilina la un interval de timp de 77- 451 de zile de la inițiere (Tabel 10).

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 reinfecțați cu a doua tulpină, prezentând o diferență de 26-1126 SNP în comparație cu tulpina de bază. În total, 4/26 (15,4%) tulpini MTBC izolate de la pacienți au dobândit rezistență la bedaquilină după 90, 159, 348 și, respectiv, 451 de zile de administrare a bedaquilinei (Tabel 10). Un izolat din perioada de după inițierea tratamentului (izolat de urmărire) (pacientul 29) cu mutația *atpE* p.I66M (frecvență de 97%) a fost fenotipic rezistent la bedaquilină, dar sensibil la clofazimină. 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 de urmărire 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) (Tabel 10).

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 reinfecțare (Tabel 10).

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 care determină rezistența încrucișată la medicamentele injectabile de linia a doua kanamicină, capreomicină și amicacină.

Tabel 10. Rezultatele testării genotipice și fenotipice la bedaquilină și clofazimină a tulpinilor de *M. tuberculosis complex* izolate pre și post-expunere la bedaquilină în schema terapeutică la pacienții TB MDR din Republica Moldova, perioada 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]

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 fluorochinolone (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 %.

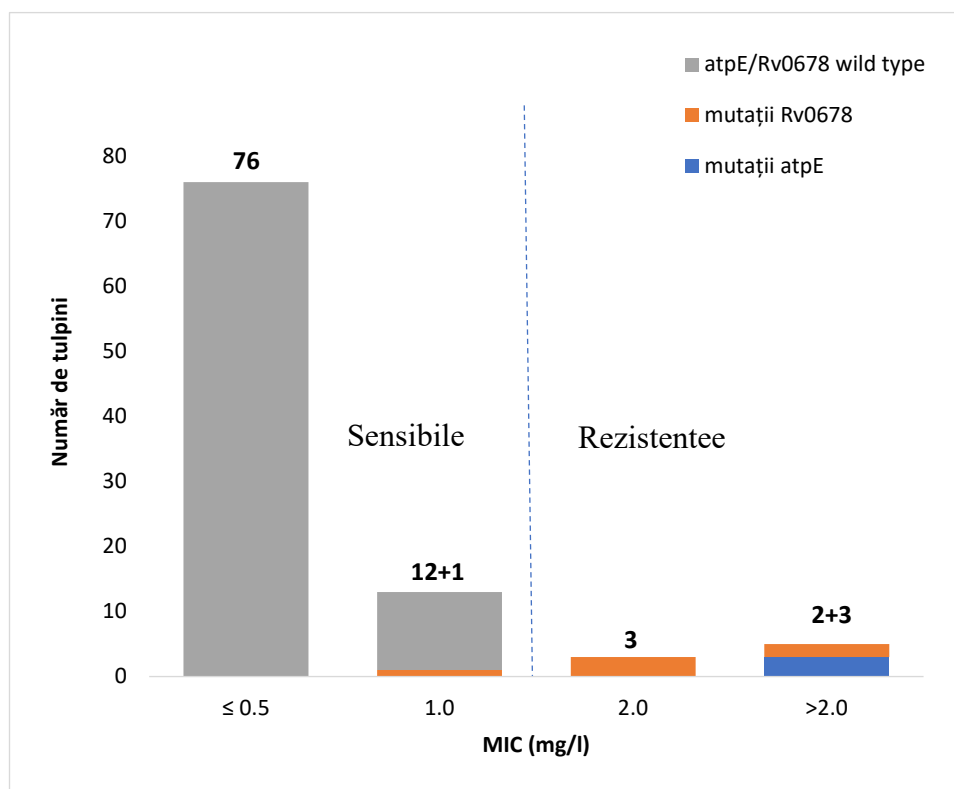


Figura 16. Concentrațiile minime inhibitorii (CMI) la bedaquilină ale tulpinilor *M. tuberculosis complex* izolate de la pacienții care au administrat bedaquilină în perioada 2016 – 2018, în Republica Moldova. Valoarea critică aprobată de OMS pentru bedaquilină este de 1 mg/L pentru sistemul MGIT960, izolatele *M. tuberculosis complex* cu CMI de bedaquilină >1 mg/L sunt considerate rezistente la bedaquilină

Rezistența la bedaquilină și factorii de risc pentru rezultatul nefavorabil al tratamentului

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 inactive în regimul care includea bedaquilină, semnificativ mai multe comparativ cu pacienții cu rezultate pozitive ale tratamentului (în medie 1,27 medicamente inactive, $p=0,02$). Pentru a identifica factorii de risc asociați eșecului terapiei sau mortalității la bolnavii cu regim de tratament care includea

bedaquilina, a fost efectuată o analiză de regresie logistică care a vizat 52 din 62 de pacienți (83,9%) pentru care datele privind rezultatele tratamentului erau disponibile.

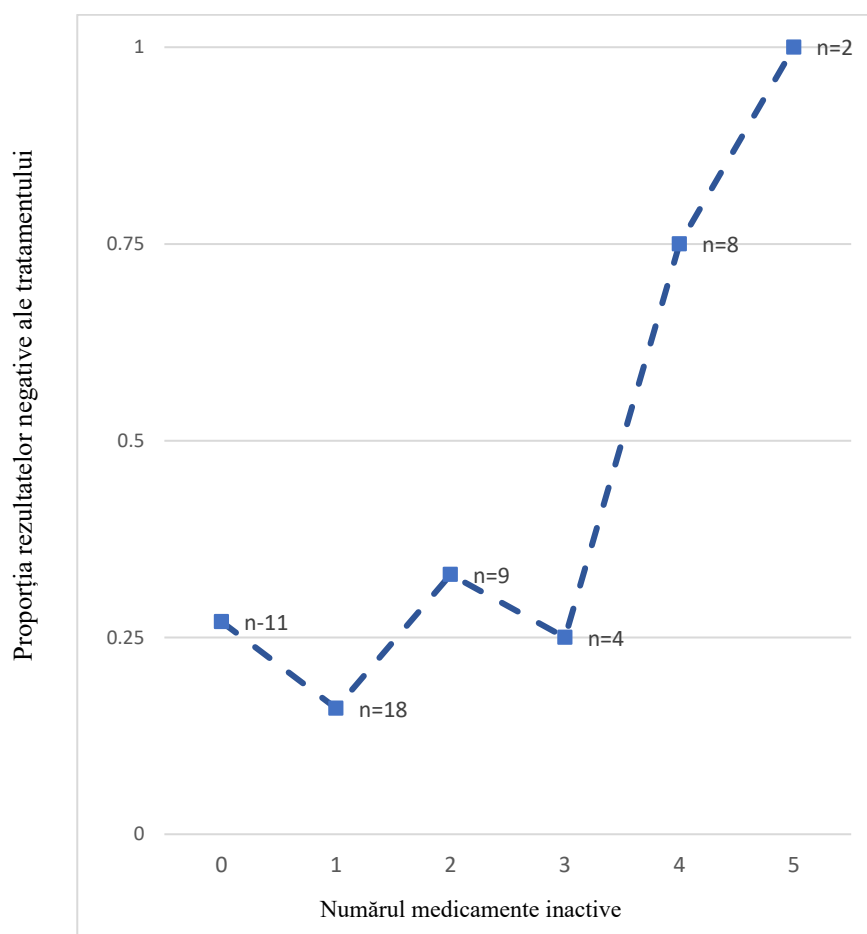


Figura 17. Asocieria dintre rezultatul negativ al tratamentului și numărul de medicamente inactivate în schema terapeutică la pacienții care au primit bedaquilină ca parte a regimului de tratament a TB MDR (2016-2018)

În cadrul analizei 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 cavitațiilor la radiografia toracică, statutul HIV, vârsta și numărul de medicamente cu rezistență demonstrată (medicamente inactivate) care au fost incluse în regimul de tratament cu bedaquilină la pacienții cu TB MDR (Tabel 9). Rezultatele analizei de regresie au indicat că prezența cavitațiilor 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 inactivate în regimul cu bedaquilină a amplificat șansele de eșec al tratamentului (OR 1,92 pe unitate de creștere, 95% CI 1,15-3,21, $p=0,012$) (Tabel 11; Figura 17).

Tabel 11. **Analiză univariată a factorilor asociați cu rezultatele negative ale tratamentului pentru tuberculoza MDR, care a inclus bedaquilina**

	Rezultat negativ (n=15)	%	Rezultat pozitiv (n=37)	%	OR	95% CI inferior	95% CI superior	P
Linia								
L2	8	53,3	20	48,6	REF			
L4	7	46,7	17	51,4	1,03	0,31	3,43	1,0
Genul								
Feminin	4	26,7	6	19,4	REF			
Masculin	11	73,3	31	83,8	0,53	0,13	2,25	0,4
Tip caz								
Cazuri noi	4	26,7	13	32,4	REF			
Tratat anterior	11	73,3	24	67,6	1,49	0,39	5,63	0,7
Categoria rezistenței								
Nu este XDR*	6	40,0	18	35,1	REF			
XDR*	9	53,3	19	45,9	1,42	0,42	4,80	0,8
Cavități								
Absente	0#	0,0	13#	32,4	REF			
Prezente	15#	100,0	24#	67,6	17,08	0,95	308,6	0,01*
Statut HIV								
Negativ	11	73,3	34	91,9	REF			
Pozitiv	4	26,7	3	8,1	4,12	0,80	21,34	0,2
Medicamente inactice (n) mediana		2		1	1,92	1,15	3,21	0,01*
Vârsta (mediana)		35		41	0,97	0,90	1,04	0,4

Corecția Haldane-Anscombe adăugând 0,5 la fiecare celulă pentru a permite calcularea raportului de probabilitate. *XDR - rezistență extinsă la medicamente (clasificarea OMS până în 2020), adică rezistența la o fluorochinolonă și la un medicament injectabil de linia a doua, OR=odds ratio, HIV - virusul imunodeficienței umane.

3.3 Sinteza și interpretarea rezultatelor privitor la achiziționarea rezistenței la bedaquilină a tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis complex*

În cadrul acestui studiu, a fost descris și caracterizat fenomenul de achiziționare a rezistenței la bedaquilină a tulpinilor de *M. tuberculosis complex* în primii 2 ani de la introducerea acestui medicament în schemele de tratament al TB MDR, în Republica Moldova, astfel, în izolatele disponibile s-a observat o rată de 15% a rezistenței față de acest medicament.

Rezultatele obținute, argumentează că șansele unui rezultat nefavorabil al tratamentului TB MDR cresc semnificativ odată cu prezența cavităților pulmonare și creșterii numărului de medicamente ineficiente incluse în regimul terapeutic inițial. Cu toate acestea, este de remarcant faptul că, în ciuda numărului considerabil de bolnavi cu retratament al tuberculozei și a profilurilor extinse de rezistență la medicamente, în cohorta analizată regimurile terapeutice care

au inclus bedaquilina au permis atingerea unei rate de vindecare de 71%. Acest rezultat favorabil este confirmat și de numărul general redus de culturi pozitive în perioada de supraveghere a tratamentului.

Anterior, a fost raportat, că apariția rezistenței la bedaquilină a fost prioritar înregistrată, la pacienții cu istoric de tratament antituberculos [182]. La fel, concentrațiile minime inhibitorii (CMI) ridicate în rândul izolatelor de la pacienții care nu au fost niciodată expuși la bedaquilină și/sau clofazimină pot compromite eficacitatea potențială a regimurilor de tratament TB MDR aprobate în prezent [183,184]. Rezultatele prezentului studiu, în care toate izolatele de până la tratament au arătat sensibilitate la bedaquilină, indică faptul că succesul terapiilor care includ bedaquilină se bazează pe un regim de fond funcțional care exclude rezistențele subiacente la antibioticele administrate [185].

Un alt factor semnificativ, asociat cu rezultatele tratamentului, este prezența cavităților pulmonare, care amplifică riscul apariției rezistenței la medicamente, cel mai probabil din cauza încărcăturii bacteriene mai mari [186]. De asemenea, cavitățile mai extinse pot împiedica medicamentele să ajungă la leziunea centrală, care conține cea mai mare încărcătură bacteriană [187]. De exemplu, clofazimina nu pătrunde eficient în centrul necrotic al leziunilor cazeoase, iar bedaquilina se acumulează mai degrabă în regiunile celulare ale unui granulom, în timp ce linezolidul și moxifloxacina pătrund eficient în toate tipurile de leziuni. Astfel, cavitățile furnizează un mediu complex pentru tulpina MTBC infectantă, cu concentrații variabile de medicamente, iar nivelurile de bedaquilină pot scădea temporar sub concentrațiile eficiente. Acest micro-mediu schimbător poate selecta diferite subpopulații de clone rezistente la bedaquilină, dar rămân și bacterii susceptibile care nu prezintă mutații în genele canonice de rezistență [188,189].

Aspecte complexe precum patologia granuloamelor, farmacocinetica și farmacodinamica, de obicei, nu sunt luate în considerare în practica clinică de rutină. Cu toate acestea, o testare rapidă și cuprinzătoare a sensibilității la medicamente este esențială pentru un tratament personalizat al TB MDR [190]. De menționat că rezistența la pirazinamidă, de exemplu, nu este testată de rutină în multe țări cu o incidență ridicată de TB MDR, iar fluorochinolonele pot fi administrate în continuare pacienților, chiar și în cazul rezistenței dovedite, atunci când nu sunt disponibile alte antibiotice. Este important să subliniem riscul imediat de dezvoltare a rezistenței atunci când bedaquilina este administrată în regimuri de tratament parțial ineficiente [191,192].

Diagnosticarea TB MDR este dificilă în prezent din cauza lipsei unor teste genotipice rapide, din sputa nativă, care ar exclude rezistența la medicamentele din grupa A de medicamente anti TB MDR (conform OMS), inclusiv bedaquilina și linezolidul. Abordări noi, precum secvențierea timpurie și țintită de nouă generație (tNGS), pot completa testele fenotipice de

confirmare și poate îmbunătăți managementul pacienților cu TB MDR în țările cu povară înaltă a acestei boli precum Republica Moldova [192,193].

În contextul Republicii Moldova, conceperea regimurilor de tratament de linia a doua este determinată de disponibilitatea medicamentelor [194]. Aderența slabă la tratament, întreruperea tratamentului și refuzul pacienților de a lua medicamentele contribuie, probabil, la selectarea tulpinilor rezistente la bedaquilină. Creșterea gradului de conștientizare a pacienților cu privire la importanța respectării tratamentului și la aprovizionarea regulată cu medicamente este crucială pentru a concepe terapii MDR-TB eficiente și pentru a reduce riscul de evoluție a rezistenței.

Costurile ridicate ale bedaquilinei, lipsa dovezilor privind siguranța medicamentului, experiența limitată în privința efectelor secundare, a complicat punerea în aplicare programatică a bedaquilinei în Republica Moldova, la momentul realizării acestui studiu. Acești factori au fost motivele pentru care doar 203 pacienți au fost tratați cu bedaquilină în Republica Moldova în perioada de studiu 2016-2018, în comparație cu toți pacienții MDR-TB eligibili în acest interval de timp.

Prezentul studiu are unele limitări, cum ar fi preluarea izolatelor MTBC doar de la 35% dintre toți pacienții tratați cu bedaquilină între 2016 - 2018 în Republica Moldova. Această limitare subliniază importanța accesului universal la testarea sensibilității la medicamente pentru studiile viitoare și necesitatea stocării sistematice a tulpinilor MTBC MDR în biobanca locală.

Eșantionarea izolatelor MTBC în acest studiu a avut loc înainte de investigațiile fenotipice și genotipice și nu a fost influențată de rezistența la bedaquilină. Rezistența dobândită la bedaquilină este observată în principal în rândul pacienților cu un timp mai lung de conversie a culturilor, pe fondalul timpului general de conversie rapidă a culturilor în cazul tratamentului cu bedaquilină și, prin urmare, a lipsei culturilor de urmărire pentru mulți pacienți.

În plus, boala cavitară este asociată cu rezultate negative ale tratamentului, dar probabil contribuie, de asemenea, și la apariția rezistenței la antibiotice în timpul tratamentului și trebuie să fie luată în considerare ca factor coliniar pentru orice asociere între rezistență și rezultatul tratamentului.

3.4 Concluzii la capitolul 3

1. Rezistența la bedaquilină a fost achiziționată în 15% din tulpinile MTBC a pacienților cu TB MDR cu izolate bacteriene disponibile înainte și în timpul tratamentului cu bedaquilină;
2. Terapia TB MDR cu un număr insuficient de medicamente active și boala cavitară au fost considerate factori de risc pentru eșecul terapeutic și deces în această cohortă;

3. Disponibilitatea unor regimuri de tratament adecvate pe baza informațiilor furnizate de teste genotipice și fenotipice de sensibilitate complete este esențială pentru a îmbunătăți rezultatele tratamentului TB MDR și pentru a evita progresarea rezistenței la medicamente în tulpinile MDR MTBC aflate în circulație;
4. Achiziționarea rezistenței la bedaquilină este observată din ce în ce mai frecvent în rândul pacienților cu tuberculoză multidrog-rezistentă. Această adaptare a bacteriilor *Mycobacterium tuberculosis* poate compromite eficacitatea tratamentului și impune necesitatea strategiilor inovatoare de gestionare a rezistenței.

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

În ultimii ani, în practica clinică au fost introduse mai multe medicamente antituberculoase. Printre acestea se numără linezolidul, un derivat al oxazolidinonei, care a fost clasificat de Organizația Mondială a Sănătății (OMS) ca un medicament de grupa A pentru tratamentul TB MDR [195,196]. Aceasta presupune că linezolidul este recomandat pentru toți pacienții cu TB MDR atunci când tulpina de *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) este sensibilă la acest medicament. Recent, Protocolul clinic național pentru tuberculoza la adulți a fost revizuit și ajustat conform recomandărilor recente ale Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), inclusiv în ceea ce privește utilizarea linezolidului în tratamentul pacienților cu tuberculoză multidrog rezistentă. Astfel, utilizarea linezolidului se extinde progresiv în acest context [156]. Totuși, rata rezistenței la linezolid în tulpinile de MTBC izolate în condiții clinice variază considerabil în studiile publicate până în prezent [197]. Linezolidul a fost considerat o opțiune promițătoare, dar răspândirea continuă a tulpinilor rezistente la acest medicament ar putea limita eficacitatea sa în viitor. Există două aspecte-cheie care ar putea contribui la apariția rezistenței la linezolid în tulpinile de MTBC. Rezistența la linezolid este în principal asociată cu mutații în genele *rrl* și *rplC*. Mutațiile G2061T și G2576T în gena *rrl*, care codifică ARNr 23S, sunt asociate cu niveluri ridicate de rezistență la linezolid, în timp ce mutațiile în *rplC*, care codifică proteina ribosomală L3 (cum ar fi mutațiile T460C, C462G și C463G), au fost asociate cu un fenotip de rezistență de nivel scăzut. De asemenea, mutațiile *rrl* G2270C și A2810T ar putea conferi o rezistență de nivel scăzut la linezolid [198,199]. Este esențial să fie studiată și înțeleasă evoluția rezistenței la linezolid în tulpinile de MTBC pentru a adapta corespunzător strategiile de tratament și pentru a asigura eficacitatea terapiei împotriva TB MDR.

Corelațiile genotipice ale rezistenței la linezolid nu sunt încă pe deplin cunoscute și necesită cercetări suplimentare. În special, sunt limitate datele privind tulpinile de MTBC izolate de la pacienții din țările cu povara înaltă a tuberculozei multidrog-rezistente din Europa de Est [197].

Pentru o utilizare clinică mai eficientă a acestui medicament, este crucial să se înțeleagă mecanismele genetice implicate în dezvoltarea rezistenței la linezolid, precum și factorii de risc asociați. În acest studiu, ne propunem să descriem spectrul mutațiilor asociate cu rezistența la linezolid și să evaluăm potențialii factori de risc asociați cu această rezistență, folosind un set de tulpini MTBC MDR izolate de la pacienții din Republica Moldova care au avut expunere terapeutică anterioară la linezolid.

4.1 Material și metode

A fost realizat un studiu retrospectiv transversal pe un set de tulpini MTBC preluate din biobanca Laboratorului Național de Referință în Microbiologia Tuberculozei (LNR). Inițial 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 în schema de tratament în orice perioadă, pe parcursul ultimilor doi ani (Figura 18). Au fost considerate eligibile pentru studiu doar tulpinile MTBC izolate de la pacienții cu expunere cumulativă la linezolid mai mare de 30 de zile. De la fiecare pacient eligibil a fost inclusă doar o singură tulpină de MTBC izolată din spută. Caracteristicile demografice și datele clinice ale pacienților, din sputa cărora au fost izolate tulpinile de MTBC incluse în studiu, precum și detaliile privind expunerea terapeutică la linezolid au fost extrase din Registrul național electronic al bolnavilor TB (SIME-TB). De asemenea, din SIME-TB au fost preluate datele privind testul fenotipic de sensibilitate la medicamente (TSM) în bază de cultură al tulpinilor incluse, evaluat la momentul stocării tulpinilor în biobancă.

LNR asigură tot spectrul de teste microbiologice pentru diagnosticul TB la pacienții consultați și/sau internați la Institutul de ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc". De asemenea, LNR asigură creșterea și izolarea culturii MTBC din sputa pacienților și testarea sensibilității fenotipice, pentru un spital de TB de nivel secundar din Chișinău și pentru cabinetele TB din Chișinău și din zona de sud a țării. La fel, asigură evaluarea controlului calității pentru trei laboratoare regionale de TB existente în țară. Din totalul probelor procesate în mod curent la LNR, culturile pozitive izolate din spută și procesate în scop de diagnostic sunt de obicei stocate în biobancă. De asemenea, o parte dintre culturile pozitive efectuate pentru urmărirea tratamentului sunt stocate în biobancă, în deosebi în cazul bolnavilor cu tuberculoză, care nu reușesc să obțină conversia culturii.

Teste microbiologice

După includerea în studiul a probelor, toate tulpinile MTBC au fost re-însămânțate, cu extragerea ulterioară a ADN-ului și secvențierea întregului genom. Re-însămânțarea a fost realizată pe medii solide (Löwenstein-Jensen) în conformitate cu recomandările tehnice ale OMS. Pentru toate tulpinile de MTBC re-însămânțate, a fost efectuată testarea sensibilității fenotipice pentru concentrațiile de linezolid: 0,5 mg/L, 1,0 mg/L (concentrație critică recomandată de OMS) și 2,0 mg/L, fiind utilizat sistemul BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, SUA) [1]. Testele de sensibilitate antimicrobiană de rutină pentru alte antibiotice au fost efectuate în MGIT960, la concentrații critice recomandate de OMS, fiind realizate în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Becton Dickinson, SUA).

Extragerea ADN

Extragerea ADN-ului MTBC a fost realizată conform protocolului:

La prima etapă (prima zi) coloniile de MTBC re-însămânțate au fost transferate într-un tub de micro-centrifugare (2,0 ml) care conținea 400 μ l de tampon TE, apoi încălzite timp de 20 de minute la 80°C pentru a fi distruse bacteriile. După 3 minute de centrifugare la 13000 rotații, supernatantul, a fost înlăturat și s-au adăugat 400 μ l de tampon TE, urmat de vortexare pentru a separa celulele. Apoi s-au adăugat 50 μ l de lizozim (10 mg/ml), s-a vortexat scurt și s-a incubat soluția peste noapte la 37 °C.

A doua etapă (a doua zi), s-au adăugat 70 μ l de SDS 10 %, 5 μ l de proteinază K (10 mg/ml), s-a vortexat ușor și s-a incubat soluția 10 minute la 65°C. Ulterior, s-a adăugat 100 μ l de NaCl 5M, 100 μ l de CTAB/NaCl (preîncălzit la 65°C), urmat de vortexare și incubare timp de 10 min la 65 °C. Apoi au fost adăugate 750 μ l de amestec cloroform/izoamilcool, cu inversarea și centrifugarea ulterioară a tuburilor la temperatura camerei timp de 15 min, la 13000 rotații. După care supernatantul apos a fost transferat cu grijă într-un nou tub de micro-centrifugă, fiind adăugat un volum de 0,6 de izopropanol pentru precipitarea acizilor nucleici timp de 30 min la -20 °C (sau mai mult). Apoi s-a centrifugat la 13000 rotații, timp de 10 minute la temperatura camerei, a fost înlăturat supernatantul și spălat ADN-ul în 0,5 ml de etanol 75 %, inversând tubul de câteva ori, urmat de o centrifugare de 5 minute la temperatura camerei și înlăturarea cu grijă a supernatantului. Stratul de ADN a fost uscat la 60°C timp de aproximativ 10 minute, iar ADN-ul a fost dizolvat în cele din urmă în 100 μ l de tampon TE la 37 °C timp de 30 de minute sau la temperatura camerei până când ADN-ul s-a dizolvat complet.

Secvențierea întregului genom

După extragerea ADN-ului din tulpinile de MTBC izolate a fost realizată secvențierea întregului genom MTBC la Centrul de cercetări Borstel, Germania. S-au utilizat librării de ADN de tip perechi și tehnologia Illumina (Nextera-XT și NextSeq500) în conformitate cu instrucțiunile producătorului (Illumina, SUA). Fișierele Fastq (datele primare de secvențiere) au fost aliniat la genomul de referință *M. tuberculosis complex* H37Rv (ID GenBank: NC_000962.3) utilizându-se filtrul MTBseq [8]. Media minimă de acoperire a genomului a fost de 50x. Au fost analizate toate mutațiile, fiind luate în considerare mutațiile (polimorfisme pentru un singur nucleotid (SNP), inserții și deleții) în 92 de gene implicate în rezistența la medicamente cu cel puțin o citire în ambele direcții, și o citire care să identifice alela cu un scor phred de cel puțin 20. Predicția rezistenței genotipice a fost realizată în baza unui catalog de mutații din cadrul Centrului de cercetări Borstel, Germania, pe baza informațiilor disponibile la data de 3 iulie 2020.

Metode de analiză statistică

Analiza statistică a fost efectuată în programul GraphPad Prism9 v9.2.0., fiind considerate statistic semnificative variabilele cu valoarea p mai mică de 0,05. La analiza statistică variabilele categoriale au fost prezentate ca valori procentuale și variabilele continue au fost prezentate sub formă de medii sau mediane cu deviație standard sau intervalul dintre cuartile, corespunzător. La compararea variabilelor continue parametrice și neparametrice s-a utilizat testul t-student sau testul Mann-Whitney, corespunzător, iar pentru compararea frecvențelor s-a aplicat testul exact a lui Fischer. În cazul comparațiilor variabilelor împerecheate s-a folosit testul Wilcoxon. Pentru a evalua asocierea dintre potențialii factori de risc și rezistența la linezolid, s-a efectuat o analiză de regresie logistică, în cadrul căreia fiecare variabilă independentă întâi a fost evaluată prin regresie logistică univariată. Variabilele care au avut o valoare p mai mică de 0,25 au fost analizate în modelul de regresie logistică multiplă.

Considerații etice

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

4.2 Rezultatele aprecierii rezistenței genotipice și fenotipice la linezolid a *M. tuberculosis complex* multidrog rezistente

Din totalul de 1928 de pacienți TB MDR care au început tratamentul în perioada 2017-2018 doar în cazul a 629 au fost identificate tulpini MTBC izolate din sputa pacienților cu TB MDR, care au avut cel puțin o cultură de MTBC stocată în biobanca Laboratorului Național de referință în Microbiologia Tuberculozei.

Dintre aceștia două sute patruzeci și șase (39,1%) de bolnavi au primit linezolidul ca parte a regimului de tratament pentru TB, cu o durată variabilă pe parcursul ultimilor 2 ani, înainte de prelevarea sputei. Doar în cazul a 74 de pacienți a fost identificată cel puțin o cultură de MTBC, stocată în LNR, după inițierea tratamentului cu linezolid și o durată de expunere la linezolid mai mare de 30 de zile (Figura 18). Din 74 de tulpini eligibile, creșterea MTBC s-a reușit în cazul a 52 (70,3%) care au fost incluse în studiul dat.

Caracteristicile lotului de studiu

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) (Tabel 12).

Majoritatea tulpinilor analizate aparțin liniei genotipice L2 (Beijing) - 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 (Figura 19). 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*) (Tabel 13) ce codifică proteina ribozomală L4.

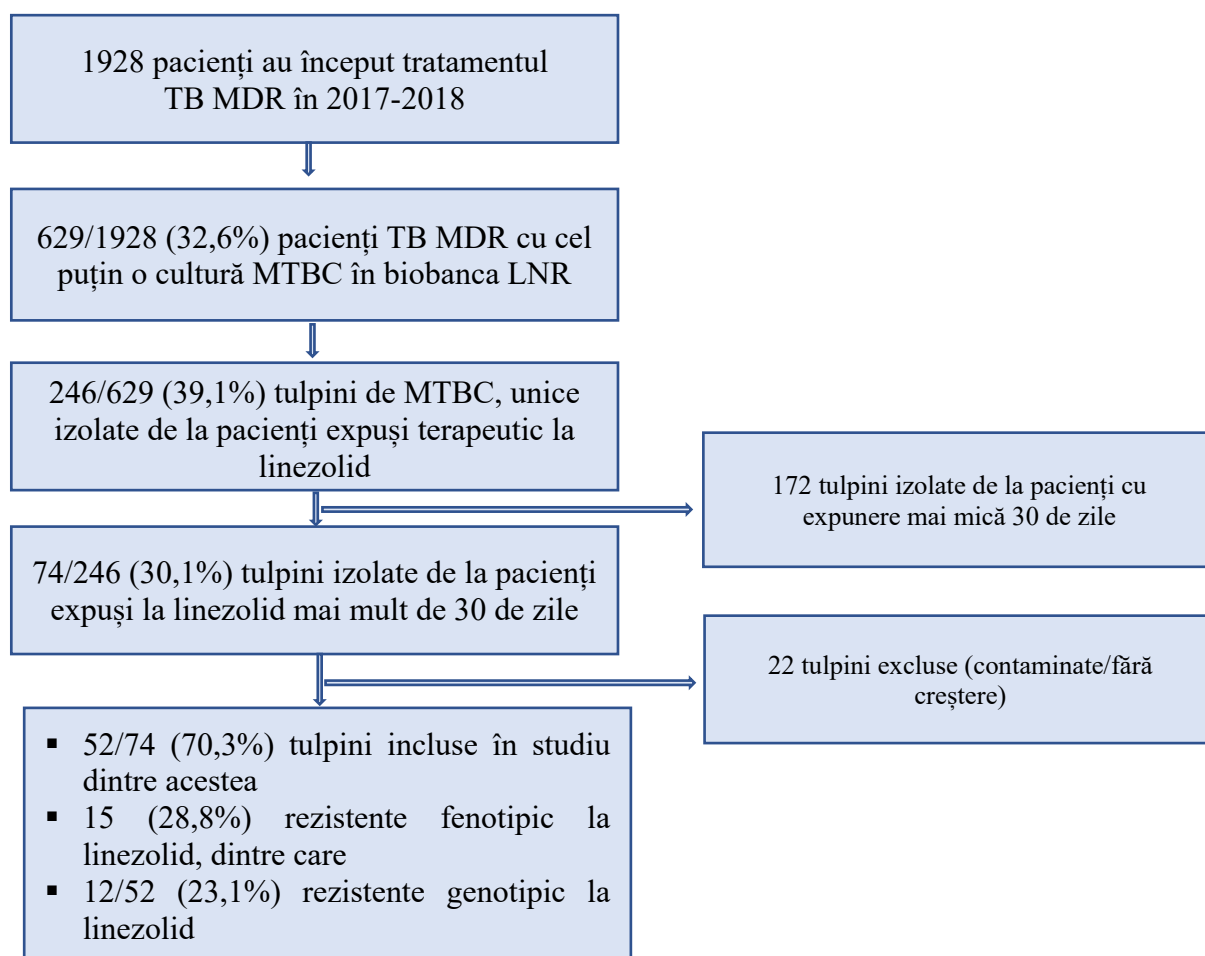


Figura 18. Selectarea tulpinilor *M. tuberculosis* izolate de la pacienții TB MDR cu expunere la linezolid

Rata tulpinilor MTBC izolate de la pacienții aflați la retratament 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 (ÎC 404,5 - 705,5) față de 257,5 (ÎC 120,5 - 376,5), $p = 0,0001$ și 1,5 (ÎC 1,0 - 3,0) față de 4,0 (ÎC 2,5 - 4,0), $p = 0,0001$, respectiv). Nu s-au constatat alte diferențe semnificative dintre pacienții cu tulpini rezistente la linezolid și cei cu tulpini sensibile la linezolid, cu excepția vârstei acestora ($33,5 \pm 5,3$ vs $39,9 \pm 8,8$, $p = 0,01$; Tabelul 12).

Tabel 12. Caracteristica cohorței

	Total N=52; n(%)	LNZ rezistent N=12; n(%)	LNZ sensibil N=40; n(%)	p
Genul (bărbați)	35 (67,3)	8 (66,7)	27 (67,5)	1,0
Vârsta; media \pm DS	38,5 \pm 8,5	33,5 \pm 5,3	39,9 \pm 8,8	0,01
Reședință urbană	22 (42,3)	4 (33,3)	18 (45,0)	0,52
HIV pozitiv	9 (17,3)	4 (33,3)	5 (12,5)	0,18
Leziuni cavitate	44 (84,6)	10 (83,3)	34 (85,0)	1,0
Retratament după eșec	35 (67,3)	11 (91,7)	24 (60,0)	0,08
MTBC linia 2 (Beijing)	33 (63,5)	7 (58,3)	26 (65,0)	0,74
MTBC linia 4 (Ural/LAM)	19 (36,5)	5 (41,7)	14 (35,0)	0,74
MDR + FQ rezistent	40 (76,9)	10 (83,3)	30 (75,0)	0,71
Doze LNZ; media (ÎC)	347,0 (165,0-470,5)	576,5 (404,5-705,5)	257,5 (120,5-376,5)	0,0001
Înterupere LNZ	4 (7,7)	1 (8,3)	3 (7,5)	1,0
Medicamente active în schema de tratament cu LNZ; mediana (ÎC)*	3,0 (2,0-4,0)	1,5 (1,0-3,0)	4,0 (2,5-4,0)	0,0001
Mutații compensatorii	38 (73,1)	10 (83,3)	28 (70,0)	0,5

Notă: MTBC – Mycobacterium tuberculosis; FQ – fluoroquinolone, LNZ – linezolid, DS – deviația standart, ÎC – intervalul dintre cuartile, LNZ- linezolid, * - evaluat conform datelor de secvențiere a întregului genom.

Rezistența genotipică și fenotipică a tulpinilor de MTBC

Majoritatea tulpinilor analizate aparțin liniei genotipice L2 (Beijing) - 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 (Figura 19). 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*) (Tabel 13) 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*.

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.

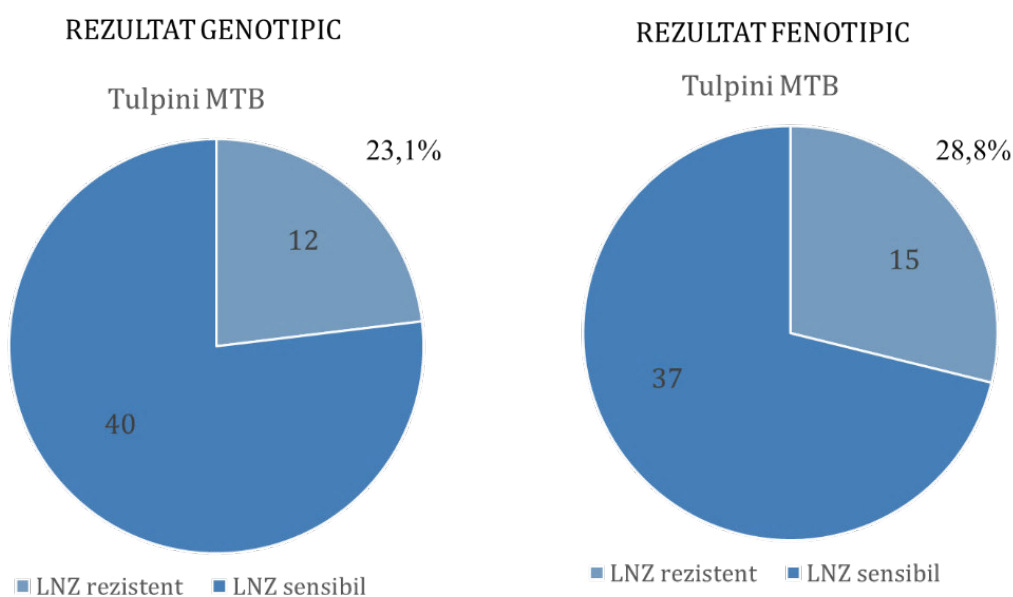


Figura 19. Rezistența geno-fenotipică a tulpinilor *M. tuberculosis* la linezolid (n=52)

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 21).

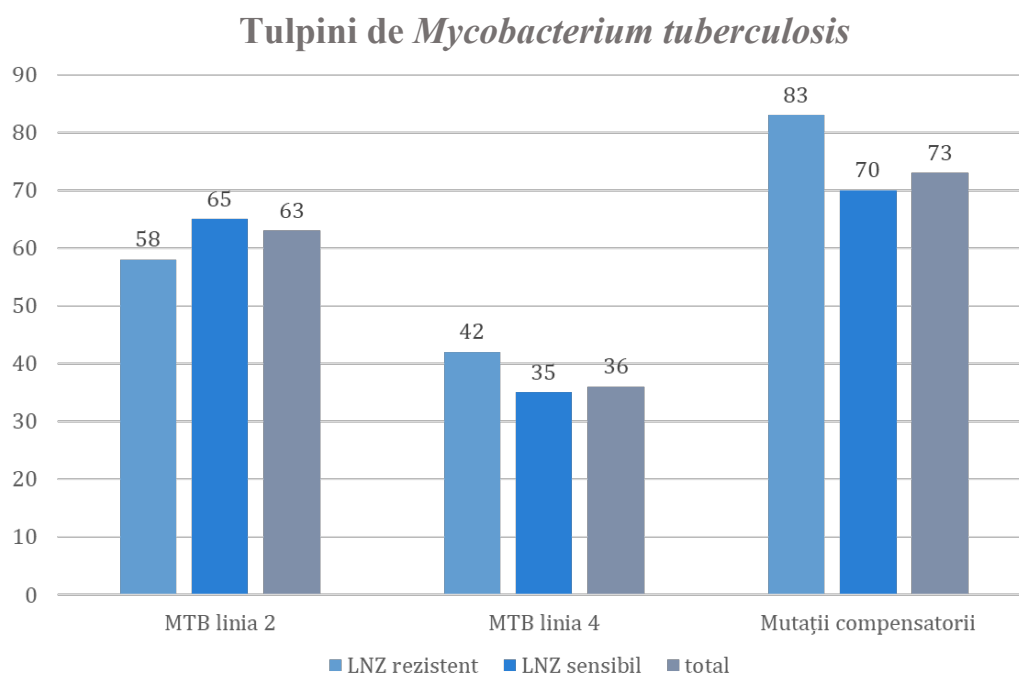


Figura 20. Rata tulpinilor *M. tuberculosis* rezistente la linezolid pe linii genotipice și mutații compensatorii

De menționat că o proporție semnificativă (76,9%) dintre tulpinile rezistente la linezolid prezentau și rezistență suplimentară la fluorochinolone. Totuși, nu s-au observat diferențe statistice în ceea ce privește rata de rezistență la fluorochinolone, mutațiile compensatorii sau frecvența liniilor genotipice între tulpinile rezistente și cele sensibile la linezolid (Figura 20).

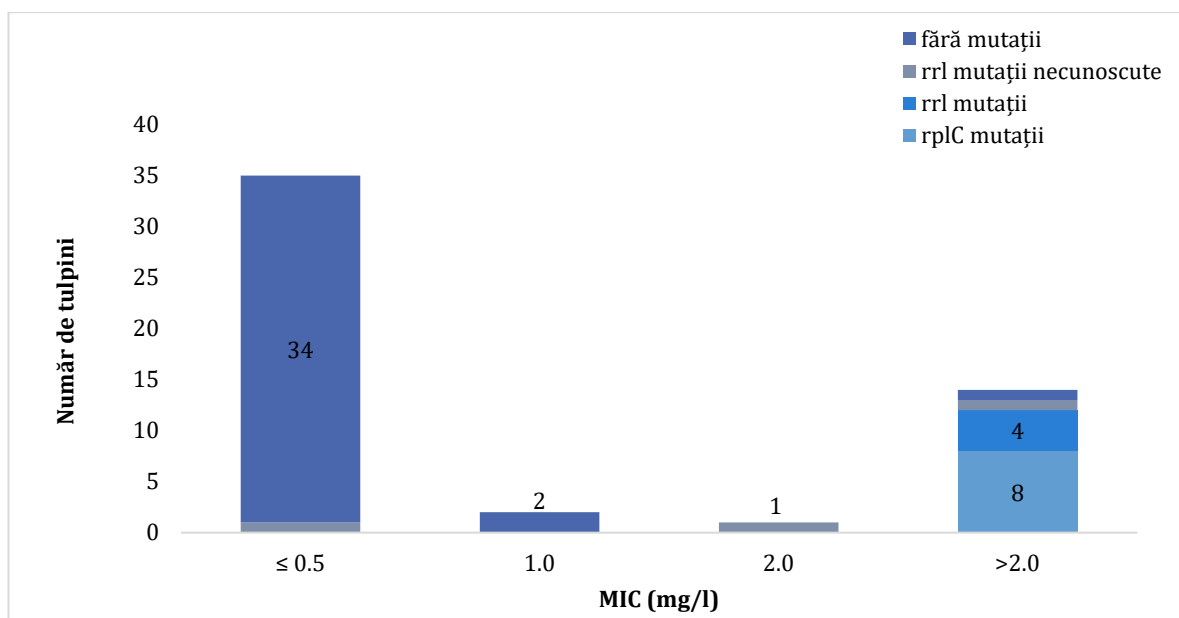


Figura 21. Distribuția concentrațiilor minime inhibitorii (CMI) la linezolid pentru tulpinile *M. tuberculosis* și rezultatele secvențierii

Tabel 13. Mutațiile *M. tuberculosis complex* în genele *rrl* și *rplC* cu rezistență fenotipică la linezolid

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

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

4.3 Factorii de risc asociați cu rezistența la linezolid a tulpinilor de *M. tuberculosis complex* multidrog-rezistente

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 (Tabel 14).

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

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; $p = 0,04$) (Tabel 15). 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).

Tabel 14. Factori de risc pentru rezistența la linezolid, regresie logistică univariată

Factor	β	SE	p	OR	95% CI
Genul (femei)	0,04	0,70	0,96	1,04	0,24 - 3,97
Vârsta	-0,13	0,06	0,03	0,88	0,76 - 0,97
Reședința urbană	-0,49	0,69	0,5	0,61	0,14 - 2,28
Total doze linezolid	0,01	0,00	0,001	1,01	1,005 - 1,02
Întrerupere linezolid	0,11	1,21	0,92	1,12	0,05 - 9,80
Mutații compensatorii	-0,76	0,85	0,37	0,47	0,06 - 2,13
Medicamente active în schema de tratament	-1,49	0,47	0,00	0,23	0,07 - 0,49
MBTC linia 2	-0,28	0,67	0,67	0,75	0,20 - 2,97
Leziuni cavitare	-0,13	0,89	0,89	0,88	0,17 - 6,66
HIV pozitiv	1,25	0,78	0,11	3,50	0,73 - 16,43

Notă: MTBC – Mycobacterium tuberculosis, SE – eroarea standart, OR – raportul șanselor, 95% CI – 95% intervalul de încredere.

Asocierea dintre numărul de medicamente active din regimul de tratament și rezistența la linezolid, este una importantă, din perspectiva gestionării tratamentului TB MDR, aceasta ne-a determinat să realizăm o analiză comparativă între numărul de medicamente active din schemele de tratament prescrise pacienților și rezistența la linezolid, folosind rezultatele fenotipice, testele de sensibilitate și datele de secvențiere genomice (WGS).

Tabel 15. Factori de risc pentru rezistența la linezolid, regresie logistică multiplă

Factor	β	SE	p	OR	95% CI
Vîrsta	-0,17	0,11	0,14	0,85	0,63 - 1,007
Total doze linezolid	0,01	0,005	0,03	1,01	1,004 - 1,03
Medicamente active în schema de tratament	-1,49	0,72	0,04	0,23	0,03 - 0,7
HIV pozitiv	0,33	1,49	0,83	1,39	0,07 - 35,7

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

Conform rezultatelor WGS, mediana numărului de medicamente active din schemele de tratament este semnificativ mai mică decât cel administrat de facto calculat în baza datelor testului de sensibilitate fenotipic sau al prezumției sensibilității la medicamentele netestate, 3 (ÎÎC 3-5) vs 5 (ÎÎC 4,5-6), corespunzător, $p < 0,0001$ (Figura 22). Această constatare are implicații semnificative în gestionarea tratamentului TB MDR. Un număr mai mic de medicamente active în schemele de tratament poate afecta eficacitatea acestora și poate contribui la dezvoltarea rezistenței la medicamente. Este important, ca medicii să fie conștienți de această discrepanță și să ajusteze schemele de tratament în funcție de rezultatele WGS, pentru a asigura un tratament eficient și durabil al pacienților cu TB MDR. La fel, acest rezultat subliniază importanța utilizării tehnologiilor avansate, precum secvențierea genomului, în gestionarea eficientă a TB MDR și în luarea deciziilor terapeutice în mod adecvat și personalizat pentru fiecare pacient.

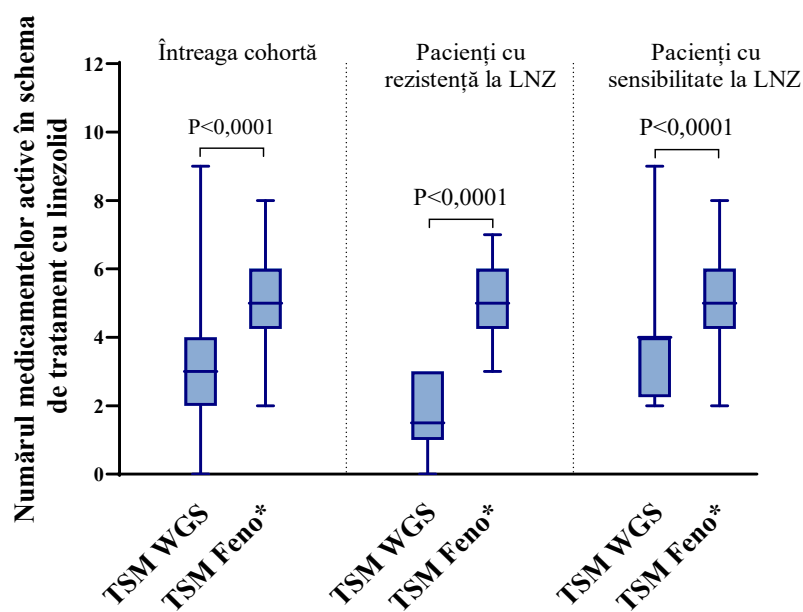


Figura 22. Medicamente active în regimul de tratament cu linezolid

4.4 Sinteza și interpretarea rezistenței la linezolid a *M. tuberculosis* complex, factori de risc și determinante genetice

În prezentul studiu, a fost identificat că rezistența genotipică la linezolid, la tulpinile de *Mycobacterium tuberculosis complex* din Republica Moldova este predeterminată de un ansamblu specific de mutații de substituție în genele *rplC* și *rrl*. În plus, am evidențiat că pacienții cu expunere anterioară la linezolid și administrarea acestuia într-un regim suboptimal, caracterizat printr-un număr redus de medicamente active în schema de tratament, prezintă un risc semnificativ pentru dezvoltarea rezistenței la linezolid.

În studiul realizat, a fost identificată o frecvență a rezistenței MTBC la linezolid de aproximativ 23,1%, situându-se în mijlocul intervalului raportat anterior, care variază între 5,5% și 33,3% [200]. Aceste diferențe în ratele de rezistență descrise în studiile publicate sunt de obicei explicate prin variații în tipurile de pacienți incluși, cu o rată mai mare de rezistență în cohortele cu un număr crescut de cazuri de retratament al TB.

Mutația 460T>C în gena *rplC* a fost identificată ca fiind responsabilă de rezistența la linezolid în majoritatea tulpinilor MTBC studiate (8 din 12 cazuri rezistente). Această constatare este în concordanță cu rezultatele anterioare, atât din studiile *in vitro*, cât și cele care au investigat tulpinile izolate de la pacienții cu tuberculoză [201].

Patru tulpini din cohorta analizată au prezentat mutații rezistente în gena *rrl*. Dintre acestea, trei mutații rezistente *rrl* (2814G>A, 2746G>A, 2270G>T) sunt printre cele mai frecvent raportate în literatură, în timp ce a patra mutație, 2810A>C, este mult mai rară și a fost descrisă în special la pacienții cu TB MDR cu eșec terapeutic [202]. Studiile anterioare indică faptul că mutațiile rezistente în gena *rrl* sunt mai puțin frecvente, dar mai variate decât cele din gena *rplC* [203]. Această constatare este confirmată și în cadrul studiului nostru. Alte trei mutații din gena *rrl* (219G>C, 2434T>C, 2691A>T) identificate la tulpinile de MTBC nu au fost anterior asociate cu rezistența la linezolid și nu au fost observate nici în cazul tulpinilor sensibile. Rolul potențial al acestor mutații în determinarea rezistenței la linezolid, urmează a fi clarificat în cercetările viitoare.

Una dintre tulpinile MTB analizate în acest studiu, deși prezenta rezistență fenotipică, nu a prezentat nicio mutație în gena *rplC* sau *rrl*. Există rapoarte anterioare despre astfel de tulpini [204]. Rezistența acestor tulpini ar putea fi asociată cu alte ținte genetice non-ribosomale. În acest context, este plauzibilă investigarea modificărilor celulare care afectează permeabilitatea celulară pentru agenții antimicrobieni, în special modificările în funcționarea pompelor de eflux și în grosimea peretelui celular [205].

În cadrul studiului nostru, valoarea maximă a CMI testată pentru linezolid (2,0 mg/l) este de două ori mai mare decât concentrația critică recomandată pentru testele de rutină. Cu toate acestea,

în cazul tulpinilor cu mutații în genele *rplC* și *rrl*, această concentrație nu a reușit să inhibe creșterea tulpinilor rezistente. Aceste rezultate confirmă utilitatea concentrației critice utilizate în mod obișnuit pentru evaluarea fenotipică a rezistenței la linezolid în practica LNR. În același timp trebuie menționat că nivelurile CMI ale linezolidului, raportate în studiile anterioare pe tulpinile de MTBC cu rezistență la acest antibiotic și mutații în genele *rplC* și *rrl*, variază semnificativ comparativ cu concentrația critică, cu o diferență de până la 4 - 32 de ori și, respectiv, 8 - 50 de ori [203].

Genotipul dominant al tulpinilor MTBC rezistente la linezolid din prezentul studiu a fost Beijing (prezent în 7 din cele 12 tulpini). Cu toate acestea, asocierea anterior raportată între genotipul Beijing și rezistența la linezolid [198] nu a fost confirmată în cohorta noastră. Potențiala cauză a acestui fapt ar fi numărul redus de cazuri studiate. Un studiu epidemiologic recent la nivel național, utilizând secvențierea completă a genomului (WGS), a evidențiat rolul tot mai important al genotipului Beijing în răspândirea TB MDR în Republica Moldova [8]. Având în vedere aceste constatări, precum și creșterea semnificativă a utilizării linezolidului, odată cu implementarea schemelor scurte de tratament pentru TB MDR, este necesară adoptarea unor strategii eficiente de farmacovigilență.

În literatura de specialitate, printre factorii de risc clinici asociați cu rezistența la linezolid s-au evidențiat expunerea anterioară la acest medicament și severitatea afectării pulmonare [206]. În cadrul cohortei noastre de pacienți expuși anterior la linezolid, principalul factor de risc asociat cu rezistența la acest medicament a fost numărul de medicamente active din schema de tratament a tuberculozei [207]. Ghidurile actuale privind tratamentul TB MDR recomandă utilizarea a 4 sau 5 antituberculoase cu eficacitate demonstrată [208]. Obiectivul combinării mai multor medicamente în tratamentul tuberculozei este de a evita monoterapia și, implicit, de a preveni selecția tulpinilor de MTBC rezistente. Din păcate, din cauza capacităților limitate de testare a sensibilității la unele dintre medicamentele pentru TB MDR (cum ar fi linezolidul și bedaquilina) sau din lipsa unor medicamente specifice pentru tratamentul TB MDR, numărul de medicamente incluse în regimurile de tratament ale pacienților din cohorta noastră a fost adesea suboptimal, ceea ce a contribuit la apariția rezistenței la linezolid. Este important de menționat că această situație reprezintă o problemă majoră în gestionarea TB MDR și în alte regiuni cu o incidență ridicată a TB MDR din Europa de Est [209]. În același timp, fenomenul aplicării unui regim cu un număr insuficient de medicamente antituberculoase (cu sensibilitate demonstrată) este prezent și în regiunile cu venituri mari per cap de locuitor, mai ales în faza inițială a tratamentului TB MDR. Acest lucru se întâmplă secundar indisponibilității testelor de evaluare rapidă a sensibilității MTBC (de exemplu, prin teste bazate pe detectarea markerilor genetici de rezistență) la

medicamentele din grupurile A și B de preparate anti-TB MDR [210]. Toate aceste aspecte subliniază necesitatea de a îmbunătăți capacitățile actuale de testare a sensibilității la medicamente și de a asigura disponibilitatea acestora.

Rezultatele acestui studiu trebuie interpretate prin prisma unor limitări inevitabile. Din cauza caracterului său retrospectiv și a constrângerilor tehnice, am putut include doar o parte din bolnavii de TB MDR care au administrat linezolid în perioada de studiu. De asemenea, datele despre caracteristicile clinice ale cazurilor studiate au fost colectate în cadrul asistenței medicale curente și nu special pentru acest studiu. Prin urmare, există posibilitatea unor inexactități în descrierea caracteristicilor clinice ale cohorței și în generalizarea rezultatelor studiului. Cu toate acestea, suntem încrezători că metoda noastră de identificare a cazurilor eligibile a fost suficient de riguroasă pentru a evita omiterea unor observații extrem de importante și că parametrii-cheie, cum ar fi durata expunerii la linezolid sau numărul de medicamente active din regimul de tratament, au fost bine documentate, ceea ce asigură soliditatea rezultatelor noastre

4.5 Concluzii la capitolul 4

1. Rezistența la linezolid este frecventă la pacienții tratați anterior cu acest medicament, spectrul determinantelor genotipice ale rezistenței fiind dominat de un set de mutații în genele *rplC* și *rrl*;
2. Numărul suboptimal de medicamente active în schema de tratament cu linezolid cresc șansele de apariție a rezistenței tulpinilor de *Mycobacterium tuberculosis complex* la acest medicament.

CONCLUZII GENERALE

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, inclusiv 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

1. Creswell J, Codlin AJ, Andre E, Micek MA, Bedru A, Carter EJ, et al. Results from early programmatic implementation of Xpert MTB/RIF testing in nine countries. *BMC Infect Dis.* 2014 Jan 2;14(1):2.
2. Diacon AH, Donald PR, Pym A, Grobusch M, Patientia RF, Mahanyele R, et al. Randomized pilot trial of eight weeks of bedaquiline (TMC207) treatment for multidrug-resistant tuberculosis: Long-term outcome, tolerability, and effect on emergence of drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jun;56(6):3271–6.
3. Nimmo C, Millard J, Faulkner V, Monteserin J, Pugh H, Johnson EO. Evolution of Mycobacterium tuberculosis drug resistance in the genomic era. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Oct;12.
4. Alame Emame AK, Guo X, Takiff HE, Liu S. Highly transmitted M. tuberculosis strains are more likely to evolve MDR/XDR and cause outbreaks, but what makes them highly transmitted? *Tuberculosis.* 2021 Jul;129:102092.
5. Bykov I, Dyachenko O, Ratmanov P, Liu H, Liang L, Wu Q. Factors contributing to the high prevalence of multidrug-resistance/Rifampicin-resistance in patients with tuberculosis: an epidemiological cross sectional and qualitative study from Khabarovsk krai region of Russia. *BMC Infect Dis.* 2022 Dec;22(1):1–13.
6. Nachega JB, Chaisson RE. Tuberculosis Drug Resistance: A Global Threat. *Clin Infect Dis.* 2003 Jan;36(Supplement_1):S24–30.
7. Kempker RR, Kipiani M, Mirtskhulava V, Tukvadze N, Magee MJ, Blumberg HM. Acquired Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis and Poor Outcomes among Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(6):992.
8. Yang C, Sobkowiak B, Naidu V, Codreanu A, Ciobanu N, Gunasekera KS, et al. Phylogeography and transmission of M. tuberculosis in Moldova: A prospective genomic analysis. *PLoS Med.* 2022 Feb 1;19(2).
9. Brown TS, Eldholm V, Brynildsrud O, Osnes M, Levy N, Stimson J, et al. Evolution and emergence of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Chisinau, Moldova. *Microb Genomics.* 2021;7(8).
10. Noroc E, Chesov D, Merker M, Gröschel MI, Barilar I, Dreyer V, et al. Limited Nosocomial Transmission of Drug-Resistant Tuberculosis, Moldova. *Emerg Infect Dis.* 2023 May 1;29(5):1046–50.
11. WHO Global Tuberculosis Report 2023. Geneva; 2023.
12. Lange C, Dheda K, Chesov D, Mandalakas AM, Udawadia Z, Horsburgh CR. Management of drug-resistant tuberculosis. *Lancet.* 2019;394(10202).
13. Seung KJ, Keshavjee S, Rich ML. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Sep;5(9).
14. Lange C, Abubakar I, Alffenaar JWC, Bothamley G, Caminero JA, Carvalho ACC, et al. Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J.* 2014 Jul;44(1):23–63.
15. Sain D, Haidarli I, Palihovici C, Răvneac L, Crivenco G, Donica A, et al. Probleme de management al controlului tuberculozei în Republica Moldova. 2012;2011–3.

16. Merker M, Kohl TA, Barilar I, Andres S, Fowler PW, Chryssanthou E, et al. Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Genome Med.* 2020 Mar 6;12(1):1–8.
17. Crudu V, Domete L, Alexandru S, Ciobanu A, Romancenco E, Noroc E, et al. Trend in TB control in Republic of Moldova: High MDRTB burden country. *Eur Respir J.* 2014;44(Suppl 58).
18. Nalivaico N. Managementul tuberculozei în condițiile epidemiologice contemporane. :37–42.
19. Vesga JF, Hallett TB, Reid MJA, Sachdeva KS, Rao R, Khaparde S, et al. Assessing tuberculosis control priorities in high-burden settings: a modelling approach. *Lancet Glob Heal.* 2019 May 1;7(5):e585–95.
20. Jenkins HE, Crudu V, Soltan V, Ciobanu A, Domete L, Cohen T. High risk and rapid appearance of multidrug resistance during tuberculosis treatment in Moldova. In: *European Respiratory Journal.* European Respiratory Society; 2014. p. 1132–41.
21. *Essential Tuberculosis.* Essential Tuberculosis. Springer International Publishing; 2021.
22. Ministerul sănătății al republicii moldova Centrul pentru Politici și Analize în Sănătate Controlul tuberculozei la nivelul asistenței medicale primare.
23. Singhal R, Myneedu VP. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Int J mycobacteriology.* 2015 Mar 1;4(1):1–6.
24. World Health Organization (WHO). Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 3 : Diagnosis -Rapid diagnostics for tuberculosis detection. WHO. 2021. 164 p.
25. Stinson KW, Eisenach K, Kayes S, Matsumoto M, Siddiqi S, Nakashima S, et al. *Mycobacteriology Laboratory Manual.* Global Laboratory Initiative, editor. 2014. 147 p.
26. Chang EW, Page AL, Bonnet M. Light-emitting diode fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis: a meta-analysis. *Eur Respir J.* 2016 Mar 1;47(3):929–37.
27. Chaidir L, Parwati I, Annisa J, Muhsinin S, Meilana I, Alisjahbana B, et al. Implementation of LED Fluorescence Microscopy for Diagnosis of Pulmonary and HIV-Associated Tuberculosis in a Hospital Setting in Indonesia. *PLoS One.* 2013 Apr 19;8(4).
28. Crudu, V., Romancenco, E. Diagnosticul microbiologic al tuberculozei. Chisinau; 2016. 248 p.
29. Moisoiu A. Metode noi și vechi în diagnosticul de laborator al tuberculozei și în depistarea rezistențelor la medicația antituberculoasă Old and new methods for the laboratory diagnosis of tuberculosis and for the detection of resistant strains to antibuberculous dr. 2014;
30. BACTEC™ MGIT™ 960 System.
31. Asmar S, Drancourt M. Rapid culture-based diagnosis of pulmonary tuberculosis in developed and developing countries. *Front Microbiol.* 2015;6(NOV):1184.
32. Miotto P, Zhang Y, Cirillo DM, Yam WC. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology.* 2018 Dec;23(12):1098–113.
33. Ray S, Das S, Suar M. Molecular Mechanism of Drug Resistance. *Drug Resist Bact Fungi, Malaria, Cancer.* 2017 Jan;47.

34. Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J*. 2005 Mar;25(3):564–9.
35. Minassian AM, Newnham R, Kalimeris E, Bejon P, Atkins BL, Bowler ICJW. Use of an automated blood culture system (BD BACTEC™) for diagnosis of prosthetic joint infections: Easy and fast. *BMC Infect Dis*. 2014 May 4;14(1):1–7.
36. World Health Organization (WHO). Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB. *Who*. 2018;106.
37. Lansbury L, Lim B, Co-infec- B V, Ma L, Wang W, Grange L, et al. Nivelul de rezistență fenotipică și paternul de mutații genice a. 2020;26(10):1395–9.
38. Penn-Nicholson A, Georghiou SB, Ciobanu N, Kazi M, Bhalla M, David A, et al. Detection of isoniazid, fluoroquinolone, ethionamide, amikacin, kanamycin, and capreomycin resistance by the Xpert MTB/XDR assay: a cross-sectional multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*. 2022 Feb;22(2):242–9.
39. Donovan J, Thu DDA, Phu NH, Dung VTM, Quang TP, Nghia HDT, et al. Xpert MTB/RIF Ultra versus Xpert MTB/RIF for the diagnosis of tuberculous meningitis: a prospective, randomised, diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*. 2020 Mar;20(3):299–307.
40. Albert H, Nathavitharana RR, Isaacs C, Pai M, Denkinger CM, Boehme CC. Development, roll-out and impact of Xpert MTB/RIF for tuberculosis: what lessons have we learnt and how can we do better? *Eur Respir J*. 2016 Aug 1;48(2):516–25.
41. World Health Orgnaization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. *World Heal Organ*. 2021;1–164.
42. Nathavitharana RR, Cudahy PGT, Schumacher SG, Steingart KR, Pai M, Denkinger CM. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2017 Jan 1;49(1):1601075.
43. Zifodya JS, Kreniske JS, Schiller I, Kohli M, Dendukuri N, Schumacher SG, et al. Xpert Ultra versus Xpert MTB/RIF for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults with presumptive pulmonary tuberculosis. *Cochrane database Syst Rev*. 2021 Feb 22;2(2).
44. Crudu, Valeriu, Stratan, Ecaterina, Romancenco Elena, Moraru, Nicolae, Turcan N. Versiunea nouă a metodei molecular genetice pentru detecția tuberculozei, precum și a rezistenței la rifampicină și izoniazidă (line probe assay genotype mtbdrplus ver2.0. *Bull Acad Sci Mold Med Sci*. 2015;2006:40–4.
45. Hillemann D, Haasis C, Andres S, Behn T, Kranzer K. Validation of the FluoroType MTBDR Assay for Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018 Jun;56(6).
46. Dippenaar A, Derendinger B, Dolby T, Beylis N, van Helden PD, Theron G, et al. Diagnostic accuracy of the FluoroType MTB and MTBDR VER 2.0 assays for the centralized high-throughput detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA and isoniazid and rifampicin resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Sep 1;27(9):1351.e1-1351.e4.
47. Beutler M, Plesnik S, Mihalic M, Olbrich L, Heinrich N, Schumacher S, et al. A pre-clinical validation plan to evaluate analytical sensitivities of molecular diagnostics such as BD MAX MDR-TB, Xpert MTB/Rif Ultra and FluoroType MTB. *PLoS One*. 2020 Jan 1;15(1).

48. Satta G, Atzeni A, McHugh TD. Mycobacterium tuberculosis and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Infect.* 2017 Feb 1;23(2):69–72.
49. Lee R. S., Behr M. A. The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. *Ther Adv Infect Dis.* 2016 Apr;3(2):47–62.
50. Amlerova J., Bitar I., Hrabak, J. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis using whole genome sequencing. Vol. 63, Folia Microbiologica. Springer Netherlands; 2018. p. 537–45.
51. Ferrarotti I, Ottaviani S. Laboratory diagnosis. *ERS Monogr.* 2019;2019(9781849841092):39–51.
52. Schmeing S, Robinson MD. ReSeq simulates realistic Illumina high-throughput sequencing data. *Genome Biol.* 2021 Dec 1;22(1).
53. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *N Engl J Med.* 2018 Oct 11;379(15):1403–15.
54. Ciobanu N. PROFILUL MUTAȚIILOR GENICE RESPONSABILE DE REZISTENȚA. *Bull Acad Sci Mold Med Sci.* 2023;74–7.
55. Soundararajan L, Kambli P, Priyadarshini S, Let B, Murugan S, Iravatham C, et al. Whole genome enrichment approach for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and drug resistance-associated mutations from direct sputum sequencing. *Tuberculosis.* 2020 Mar;121:101915.
56. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguet C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur Respir J.* 2021 Mar 1;57(3).
57. Colman RE, Mace A, Seifert M, Hetzel J, Mshaiel H, Suresh A, et al. Whole-genome and targeted sequencing of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis on the iSeq100 and MiSeq: A performance, ease-of-use, and cost evaluation. *PLOS Med.* 2019;16(4):e1002794.
58. Cabibbe AM, Spitaleri A, Battaglia S, Colman RE, Suresh A, Uplekar S, et al. Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2020 Oct 1;58(10).
59. Van Hoorde K, Butler F. Use of next-generation sequencing in microbial risk assessment. *EFSA J.* 2018 Aug;16(S1).
60. Dookie N, Khan A, Padayatchi N, Naidoo K. Application of Next Generation Sequencing for Diagnosis and Clinical Management of Drug-Resistant Tuberculosis: Updates on Recent Developments in the Field. *Front Microbiol.* 2022 Mar 24;13.
61. Shaw B, von Bredow B, Tsan A, Garner O, Yang S. Clinical Whole-Genome Sequencing Assay for Rapid Mycobacterium tuberculosis Complex First-Line Drug Susceptibility Testing and Phylogenetic Relatedness Analysis. *Microorganisms.* 2023 Oct;11(10).
62. Satta G. Narrative review (Clinical Microbiology and Infection-CMI) Title: Mycobacterium tuberculosis and whole-genome sequencing: how close are we to unleash its full potential? London; 2017.
63. Jagielski T., Miniás A, van Ingen J., Rastogi N., Brzostek A., Żaczek A., Dziadek J. Methodological and clinical aspects of the molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):239–90.

64. Crudu, V., Codreanu, A., Alexandru, S., Ciobanu N. Analiza geografică și evaluarea secvențierii genomului. *Bull Acad Sci Mold Med Sci*. 2022;174–8.
65. Ogier JC, Pagès S, Galan M, Barret M, Gaudriault S. RpoB, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiol*. 2019 Jul;19(1):1–16.
66. Zhou L, Ma C, Xiao T, Li M, Liu H, Zhao X, et al. A new single gene differential biomarker for mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculosis mycobacteria. *Front Microbiol*. 2019 Aug;10(AUG):469845.
67. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Med*. 2014 Nov;6:1–15.
68. Tănăsescu M., Didilescu C., Constantin M. Prezent și perspective în diagnosticul rapid molecular al tuberculozei și al MDR- TB. *Tuberculoza în România*. 2013;62, Nr.4(20672993):6–13.
69. ECDC. Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union. European C. Stockholm; 2018. 1–95 p.
70. Driscoll J. R. Spoligotyping for molecular epidemiology of the Mycobacterium tuberculosis complex. Vol. 551, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). Humana Press, Totowa, NJ; 2009. p. 117–28.
71. Guimaraes Ana M.S., Zimpel Cristina K. Mycobacterium bovis: From genotyping to genome sequencing. Vol. 8, Microorganisms. MDPI AG; 2020. p. 667.
72. Iakhiaeva E, McNulty S, Brown Elliott BA, Falkinham JO, Williams MD, Vasireddy R, et al. Mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem- Repeat (MIRU-VNTR) genotyping of mycobacterium intracellulare for strain comparison with establishment of a PCR-based database. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):409–16.
73. Ei Phyu W., Aung Wah W., Lee Jong S., Choi Go E., Chang Chulhun L. Molecular strain typing of Mycobacterium tuberculosis: A review of frequently used methods. Vol. 31, Journal of Korean Medical Science. Korean Academy of Medical Science; 2016. p. 1673–83.
74. Thain N., Le C., Crossa A., et al. Towards better prediction of Mycobacterium tuberculosis lineages from MIRU-VNTR data. *Infect Genet Evol*. 2019 Aug;72:59–66.
75. Merker M, Kohl TA, Niemann S, Supply P. The Evolution of Strain Typing in the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1019:43–78.
76. Cannas A., Mazzarelli A., Caro A., Delogu G., Girardi E.,. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis strains: A fundamental tool for tuberculosis control and elimination. *Infect Dis Rep*. 2016;8(2):38–42.
77. Z.CDC. Genotyping Guide | Description of Genotyping Methods | Laboratory Procedures | TB | CDC.
78. Jagielski T., Van Ingen J., Rastogi N., Dziadek J., Mazur P. K., Bielecki J. Current methods in the molecular typing of mycobacterium tuberculosis and other Mycobacteria. *BioMed Research International*. 2014. p. 1–21.
79. Gonzalo-Asensio J., Pérez I., Aguiló N., Uranga S., Picó A., Lampreave C., Cebollada A., Otal I., Samper S., Martín C. New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between Mycobacterium tuberculosis Complex lineages. *PLoS*

- Genet.* 2018 Apr;14(4):1–23.
80. Mutayoba BK, Michael Hoelscher, Heinrich N, Joloba ML, Lyamuya E, Kilale AM, et al. Phylogenetic lineages of tuberculosis isolates and their association with patient demographics in Tanzania. *BMC Genomics*. 2022 Dec;23(1).
 81. Claude Semuto Ngabonziza J, Loiseau C, Marceau M, Jouet A, Menardo F, Tzfidia O, et al. A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region.
 82. Mekonnen D, Derby A, Abeje A, Shumet A, Kassahun Y, Nibret E, et al. Genomic diversity and transmission dynamics of M. tuberculosis in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2019 Dec;23(12):1314–26.
 83. Wu B, Zhu W, Wang Y, Wang Q, Zhou L, Liu Z, et al. Genetic composition and evolution of the prevalent Mycobacterium tuberculosis lineages 2 and 4 in the Chinese and Zhejiang Province populations. *Cell Biosci*. 2021 Dec;11(1).
 84. Stiens J, Arnvig KB, Kendall SL, Nobeli I. Challenges in defining the functional, non-coding, expressed genome of members of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Mol Microbiol*. 2022 Jan;117(1):20–31.
 85. Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. Mycobacterium tuberculosis lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet*. 2016 Dec;48(12):1535–43.
 86. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Semin Immunol*. 2014 Dec 1;26(6):431–44.
 87. Anderson J, Jarlsberg LG, Grindsdale J, Osmond D, Kawamura M, Hopewell PC, et al. Sublineages of lineage 4 (Euro-American) Mycobacterium tuberculosis differ in genotypic clustering. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013 Jul;17(7):885–91.
 88. Taye Id H, Alemu K, Mihret A, Ayalew Id S, Hailu E, Wood JLN, et al. Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis lineages and strain clustering within urban and peri-urban settings in Ethiopia. 2021;
 89. Ferraris DM, Miggiano RI, Rossi F, Rizzi M. pathogens Mycobacterium tuberculosis Molecular Determinants of Infection, Survival Strategies, and Vulnerable Targets. 2018;
 90. McHenry ML, Bartlett J, Igo RP, Wampande ID EM, Benchek PI, Mayanja-Kizza H, et al. Interaction between host genes and Mycobacterium tuberculosis lineage can affect tuberculosis severity: Evidence for coevolution? 2020;
 91. Chesov D. Tuberculoza: diagnostic și tratament în era multidrog rezistenței. 2022;
 92. Shuaib YA, Utpatel C, Kohl TA, Barilar I, Diricks M, Ashraf N, et al. Origin and Global Expansion of Mycobacterium tuberculosis Complex Lineage 3. *Genes (Basel)*. 2022 Jun;13(6).
 93. Gisch N, Utpatel C, Gronbach LM, Kohl TA, Schombel U, Malm S, et al. Sub-Lineage Specific Phenolic Glycolipid Patterns in the Mycobacterium tuberculosis Complex Lineage 1. *Front Microbiol*. 2022 Mar;13:832054.
 94. Thawornwattana Y, Mahasirimongkol S, Yanai H, Maung HMW, Cui Z, Chongsuvivatwong V, et al. Revised nomenclature and SNP barcode for Mycobacterium tuberculosis lineage 2. *Microb genomics*. 2021;7(11).

95. Mycobacterium tuberculosis Lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages.
96. Yimer SA, Kalayou S, Homberset H, Birhanu AG, Riaz T, Zegeye ED, et al. Lineage-Specific Proteomic Signatures in the Mycobacterium tuberculosis Complex Reveal Differential Abundance of Proteins Involved in Virulence, DNA Repair, CRISPR-Cas, Bioenergetics and Lipid Metabolism. *Front Microbiol.* 2020 Sep;11.
97. Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, Grandjean L, Monteserin J, Debech N, et al. Global expansion of Mycobacterium tuberculosis Lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation.
98. Micheni LN, Kassaza K, Kinyi H, Ntulume I, Bazira J. Diversity of Mycobacterium tuberculosis Complex Lineages Associated with Pulmonary Tuberculosis in Southwestern, Uganda. *Tuberc Res Treat.* 2021 Jun;2021:1–6.
99. Brynildsrud OB, Pepperell CS, Suffys P, Grandjean L, Monteserin J, Debech N, et al. Global expansion of Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. *Sci Adv.* 2018 Oct;4(10):5869–86.
100. Coscolla M, Gagneux S, Menardo F, Loiseau C, Ruiz-Rodriguez P, Borrell S, et al. Phylogenomics of mycobacterium africanum reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *Microb Genomics.* 2021;7(2):1–14.
101. Nebenzahl-Guimaraes H, Yimer SA, Holm-Hansen C, De Beer J, Brosch R, Van Soolingen D. Genomic characterization of Mycobacterium tuberculosis lineage 7 and a proposed name: “Aethiops vetus.”
102. Ngabonziza JCS, Loiseau C, Marceau M, Jouet A, Menardo F, Tzfidia O, et al. A sister lineage of the Mycobacterium tuberculosis complex discovered in the African Great Lakes region. *Nat Commun.* 2020 Dec;11(1).
103. Taye H, Alemu K, Mihret A, Ayalew S, Hailu E, Wood JLN, et al. Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis lineages and strain clustering within urban and peri-urban settings in Ethiopia. *PLoS One.* 2021 Jul;16(7):e0253480.
104. Chavadi SS, Stirrett KL, Edupuganti UR, Vergnolle O, Sadhanandan G, Marchiano E, et al. Mutational and phylogenetic analyses of the mycobacterial mbt gene cluster. *J Bacteriol.* 2011 Nov;193(21):5905–13.
105. Niemann S, Supply P. Diversity and Evolution of Mycobacterium tuberculosis: Moving to Whole-Genome-Based Approaches.
106. Cohen KA, Manson AL, Abeel T, Desjardins CA, Chapman SB, Hoffner S, et al. Extensive global movement of multidrug-resistant M. tuberculosis strains revealed by whole-genome analysis. *Thorax.* 2019 Sep;74(9):882–9.
107. Phelan J, De Sessions PF, Tientcheu L, Perdigao J, Machado D, Hasan R, et al. Methylation in Mycobacterium tuberculosis is lineage specific with associated mutations present globally. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1).
108. Waman VP, Vedithi SC, Thomas SE, Bannerman BP, Munir A, Skwark MJ, et al. Mycobacterial genomics and structural bioinformatics: opportunities and challenges in drug discovery. <https://doi.org/101080/2222175120181561158>. 2019 Jan;8(1):109–18.
109. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics.* 1998 Apr;148(4):1667.

110. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, et al. Mycobacterium tuberculosis mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet.* 2013 Jul;45(7):784–90.
111. Grandjean L, Grandjean L, Grandjean L, Monteserin J, Gilman R, Gilman R, et al. Association between bacterial homoplastic variants and radiological pathology in tuberculosis. *Thorax.* 2020;75(7).
112. Romancenco E. Diagnosticul microbiologic al tuberculozei. 2016;
113. Allué-Guardia A, García JI, Torrelles JB. Evolution of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains and Their Adaptation to the Human Lung Environment. *Front Microbiol.* 2021 Feb;12:137.
114. Smith T, Wolff KA, Nguyen L. Molecular Biology of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;374:53.
115. Mosaei H, Zenkin N. Inhibition of RNA Polymerase by Rifampicin and Rifamycin-Like Molecules. *EcoSal Plus.* 2020 Dec;9(1).
116. Vilchèze C, Jacobs JR. WR. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr.* 2014 Aug;2(4):MGM2.
117. Chesov D, Ciobanu N, Lange C, Schön T, Heyckendorf J, Crudu V. Lack of evidence of isoniazid efficacy for the treatment of MDR/XDR-TB in the presence of the katG 315T mutation. *Eur Respir J.* 2017 Oct;50(4).
118. Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der heijden YF, Mayer C, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Apr;67(4):819.
119. **Chesov E**, Chesov D, Maurer FP, Andres S, Utpatel C, Barilar I, et al. Emergence of bedaquiline resistance in a high tuberculosis burden country. *Eur Respir J.* 2022;59(3).
120. Long KS, Vester B. Resistance to Linezolid Caused by Modifications at Its Binding Site on the Ribosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Feb;56(2):603.
121. Chen J, Zhang S, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y. Identification of novel mutations associated with cycloserine resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Dec;72(12):3272.
122. Doi Y, Wachino J ichi, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am.* 2016 Jun;30(2):523.
123. Zhang L, Zhang L, Zhao Y, Gao Y, Wu L, Gao R, et al. Structures of cell wall arabinosyltransferases with the anti-tuberculosis drug ethambutol. 2020;9102:1–15.
124. Lange C, Dheda K, Chesov D, Mandalakas AM, Udwadia Z, Horsburgh CR. Management of drug-resistant tuberculosis. *Lancet.* 2019 Sep 14;394(10202):953–66.
125. Kahbazi M, Sarmadian H, Ahmadi A, Didgar F, Sadrnia M, Poolad T, et al. Novel Mutations in pncA Gene of Pyrazinamide Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Sci Pharm 2018, Vol 86, Page 15.* 2018 Apr;86(2):15.
126. Mestdagh M, Fonteyne PA, Realini L, Rossau R, Jannes G, Mijs W, et al. Relationship between Pyrazinamide Resistance, Loss of Pyrazinamidase Activity, and Mutations in the

- pncA* Locus in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(9):2317–9.
127. Zhao F, Wang X De, Erber LN, Luo M, Guo AZ, Yang SS, et al. Binding Pocket Alterations in Dihydrofolate Synthase Confer Resistance to para-Aminosalicylic Acid in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Mar;58(3):1479.
 128. Fujiwara M, Kawasaki M, Hariguchi N, Liu Y, Matsumoto M. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2018 Jan;108:186–94.
 129. Alame Emame AK, Guo X, Takiff HE, Liu S. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2021 Jul;129:102091.
 130. Hughes D, Brandis G. Rifampicin Resistance: Fitness Costs and the Significance of Compensatory Evolution. *Antibiot (Basel, Switzerland).* 2013 Apr;2(2):206–16.
 131. Stefan MA, Ugur FS, Garcia GA. Source of the Fitness Defect in Rifamycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* RNA Polymerase and the Mechanism of Compensation by Mutations in the β' Subunit. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Jun;62(6).
 132. **Chesov E**, Chesov D, Reimann M, Dreyer V, Utpatel C, Gröschel MI, et al. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* strain type on multidrug-resistant tuberculosis severity, Republic of Moldova. *J Infect.* 2023 Dec;87(6):588–91.
 133. Ma P, Luo T, Ge L, Chen Z, Wang X, Zhao R, et al. Compensatory effects of *M. tuberculosis* *rpoB* mutations outside the rifampicin resistance-determining region. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):743–52.
 134. De Vos M, Müller B, Borrell S, Black PA, Van Helden PD, Warren RM, et al. Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Feb;57(2):827–32.
 135. Liu Q, Zuo T, Xu P, Jiang Q, Wu J, Gan M, et al. Have compensatory mutations facilitated the current epidemic of multidrug-resistant tuberculosis? *Emerg Microbes Infect.* 2018 Dec;7(1).
 136. Makarenkov V, Kevorkov D, Legendre P. Phylogenetic Network Construction Approaches. *Appl Mycol Biotechnol.* 2006 Jan;6(C):61–97.
 137. Crispell J, Balaz D, Gordon SV. HomoplasmyFinder: a simple tool to identify homoplasies on a phylogeny. *Microb Genomics.* 2019 Jan 1;5(1).
 138. Reyes JF, Chan CHS, Tanaka MM. Impact of homoplasmy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol.* 2012 Jun;12(4):811–8.
 139. Tantivitayakul P, Ruangchai W, Juthayothin T, Smittipat N, Disratthakit A, Mahasirimongkol S, et al. Homoplastic single nucleotide polymorphisms contributed to phenotypic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Reports 2020 101.* 2020 May 15;10(1):1–10.
 140. Hall BK. Homology and homoplasmy. *Philos Biol.* 2007;429–53.
 141. Outhred AC, Gurjav U, Jelfs P, McCallum N, Wang Q, Hill-Cawthorne GA, et al. Extensive Homoplasmy but No Evidence of Convergent Evolution of Repeat Numbers at MIRU Loci

- in Modern Mycobacterium tuberculosis Lineages. *Front public Heal*. 2020 Aug;8.
142. Lai YP, Ioerger TR. Exploiting Homoplasmy in Genome-Wide Association Studies to Enhance Identification of Antibiotic-Resistance Mutations in Bacterial Genomes. *Evol Bioinform Online*. 2020;16.
 143. Kriel M, Lotz JW, Kidd M, Walzl G. Evaluation of a radiological severity score to predict treatment outcome in adults with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015 Nov 1;19(11):1354–60.
 144. Ruesen C, Chaidir L, van Laarhoven A, Dian S, Ganiem AR, Nebenzahl-Guimaraes H, et al. Large-scale genomic analysis shows association between homoplastic genetic variation in Mycobacterium tuberculosis genes and meningeal or pulmonary tuberculosis. *BMC Genomics*. 2018 Feb;19(1).
 145. Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020 Oct 17;396(10258):1204–22.
 146. WHO. Global tuberculosis report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022.
 147. Acosta CD, Dadu A, Ramsay A, Dara M. Drug-resistant tuberculosis in Eastern Europe: Challenges and ways forward. *Public Heal Action*. 2014 Oct 21;4(Suppl 2):S3–12.
 148. Niemann S, Merker M, Kohl T, Supply P. Impact of Genetic Diversity on the Biology of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains . *Microbiol Spectr*. 2016 Dec 23;4(6).
 149. Merker M, Barbier M, Cox H, Rasigade JP, Feuerriegel S, Kohl TA, et al. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia. *Elife*. 2018 Oct 1;7.
 150. Cohen KA, Abeel T, Manson McGuire A, Desjardins CA, Munsamy V, Shea TP, et al. 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 Sep 1;12(9):e1001880.
 151. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet* 2014 463. 2014 Jan 26;46(3):279–86.
 152. Gygli SM, Loiseau C, Jugheli L, Adamia N, Trauner A, Reinhard M, et al. Prisons as ecological drivers of fitness-compensated multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Nat Med* 2021 277. 2021 May 24;27(7):1171–7.
 153. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, et al. Mycobacterium tuberculosis mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet* 2013 457. 2013 Jun 9;45(7):784–90.
 154. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023. *Glob Tuberc Rep*. 2023;
 155. Sănătății M, și Protecției Sociale al Republicii Moldova M. Protocol clinic național "Tuberculoza la adult. :2020.
 156. Ministerul Sanatatii al Republicii Moldova Tuberculoza la Adult Protocol clinic național (ediția VI).
 157. Kohl TA, Utpatel C, Schleusener V, De Filippo MR, Beckert P, Cirillo DM, et al. MTBseq:

- A comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *PeerJ*. 2018 Nov 13;2018(11):e5895.
158. Grobbel HP, Merker M, Köhler N, Andres S, Hoffmann H, Heyckendorf J, et al. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. *Clin Infect Dis*. 2021 Oct 1;73(7):1194–202.
 159. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS One*. 2010 Mar 10;5(3):e9490.
 160. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W293–6.
 161. Loiseau C, Windels EM, Gygli SM, Jugheli L, Maghradze N, Brites D, et al. The relative transmission fitness of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in a drug resistance hotspot. *Nat Commun*. 2023 Dec;14(1).
 162. Drain PK, Bajema KL, Dowdy D, Dheda K, Naidoo K, Schumacher SG, et al. Incipient and subclinical tuberculosis: A clinical review of early stages and progression of infection. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Oct 1;31(4).
 163. Merker M, Rasigade JP, Barbier M, Cox H, Feuerriegel S, Kohl TA, et al. Transcontinental spread and evolution of Mycobacterium tuberculosis W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. *Nat Commun* 2022 131. 2022 Aug 30;13(1):1–11.
 164. Farmer P, Kim JY. Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing “DOTS-plus.” *BMJ*. 1998 Sep 5;317(7159):671–4.
 165. Sterling TR, Lehmann HP, Frieden TR. Impact of DOTS compared with DOTS-plus on multidrug resistant tuberculosis and tuberculosis deaths: decision analysis. *BMJ*. 2003 Mar 15;326(7389):574.
 166. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jun 24;133(1):30–7.
 167. Ribeiro SCM, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MRM, Almeida FM, Rezende AL, et al. Mycobacterium tuberculosis strains of the modern sublineage of the beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2615–24.
 168. Coscolla M, Gagneux S. Does M. tuberculosis genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discov Today Dis Mech*. 2010 Mar 1;7(1):e43–59.
 169. Dreyer V, Mandal A, Dev P, Merker M, Barilar I, Utpatel C, et al. High fluoroquinolone resistance proportions among multidrug-resistant tuberculosis driven by dominant L2 Mycobacterium tuberculosis clones in the Mumbai Metropolitan Region. *Genome Med*. 2022 Aug 22;14(1):95.
 170. Tientcheu LD, Koch A, Ndengane M, Andoseh G, Kampmann B, Wilkinson RJ. Immunological consequences of strain variation within the Mycobacterium tuberculosis complex. *Eur J Immunol*. 2017 Mar 1;47(3):432–45.
 171. Günther G, Lange C, Alexandru S, Altet N, Avsar K, Bang D, et al. Treatment Outcomes in Multidrug-Resistant Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2016 Sep 15;375(11):1103–5.
 172. Silva DR, Dalcolmo M, Tiberi S, Arbex MA, Munoz-Torrico M, Duarte R, et al. New and repurposed drugs to treat multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. Vol. 44,

- Jornal Brasileiro de Pneumologia. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; 2018. p. 153–60.
173. Provisional CDC guidelines for the use and safety monitoring of bedaquiline fumarate (Sirturo) for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *MMWR Recomm Rep*. 2013 Oct;62(RR09):1–12.
 174. Derendinger B, Dippenaar A, de Vos M, Huo S, Alberts R, Tadokera R, et al. Bedaquiline resistance in patients with drug-resistant tuberculosis in Cape Town, South Africa: a retrospective longitudinal cohort study. *The Lancet Microbe*. 2023 Dec;4(12):e972–82.
 175. Fournier Le Ray L, Aubry A, Sougakoff W, Revest M, Robert J, Bonnet I, et al. atpE Mutation in Mycobacterium tuberculosis Not Always Predictive of Bedaquiline Treatment Failure. *Emerg Infect Dis*. 2022 May;28(5):1062.
 176. Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole ST. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 May;58(5):2979–81.
 177. Andries K, Villellas C, Coeck N, Thys K, Gevers T, Vranckx L, et al. Acquired resistance of Mycobacterium tuberculosis to bedaquiline. *PLoS One*. 2014 Jul;9(7):e102135.
 178. Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(9):2507–10.
 179. Xu J, Wang B, Hu M, Huo F, Guo S, Jing W, et al. Primary clofazimine and bedaquiline resistance among isolates from patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jun;61(6).
 180. Almeida D, Ioerger T, Tyagi S, Li SY, Mdluli K, Andries K, et al. Mutations in pepQ confer low-level resistance to bedaquiline and clofazimine in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Aug;60(8):4590–9.
 181. Diacon AH, Pym A, Grobusch MP, De Los Rios JM, Gotuzzo E, Vasilyeva I, et al. Multidrug-resistant tuberculosis and culture conversion with bedaquiline. *N Engl J Med*. 2014;371(8):723–32.
 182. Villellas C, Coeck N, Meehan CJ, Lounis N, De Jong B, Rigouts L, et al. Unexpected high prevalence of resistance-associated Rv0678 variants in MDR-TB patients without documented prior use of clofazimine or bedaquiline. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Mar;72(3):684.
 183. Nguyen TVA, Anthony RM, Bañuls AL, Vu DH, Alffenaar JWC. Bedaquiline Resistance: Its Emergence, Mechanism, and Prevention. *Clin Infect Dis*. 2018 May;66(10):1625–30.
 184. Bloemberg G V., Keller PM, Stucki D, Trauner A, Borrell S, Latshang T, et al. Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1986–8.
 185. Ahmad N, Ahuja SD, Akkerman OW, Alffenaar JWC, Anderson LF, Baghaei P, et al. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2018 Sep;392(10150):821–34.
 186. Mbuagbaw L, Guglielmetti L, Hewison C, Bakare N, Bastard M, Caumes E, et al. Outcomes of Bedaquiline Treatment in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Emerg Infect*

- Dis.* 2019 May;25(5):936–43.
187. Ong CWM, Elkington PT, Friedland JS. Tuberculosis, pulmonary cavitation, and matrix metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Jul;190(1):9–18.
 188. Nimmo C, Brien K, Millard J, Grant AD, Padayatchi N, Pym AS, et al. Dynamics of within-host *Mycobacterium tuberculosis* diversity and heteroresistance during treatment. *EBioMedicine.* 2020 May;55.
 189. de Vos M, Ley SD, Wiggins KB, Derendinger B, Dippenaar A, Grobbelaar M, et al. Bedaquiline Microheteroresistance after Cessation of Tuberculosis Treatment. *N Engl J Med.* 2019 May;380(22):2178–80.
 190. Gröschel MI, Walker TM, van der Werf TS, Lange C, Niemann S, Merker M. Pathogen-based precision medicine for drug-resistant tuberculosis. *PLoS Pathog.* 2018 Oct;14(10).
 191. Kabir S, Tahir Z, Mukhtar N, Sohail M, Saqalein M, Rehman A. Fluoroquinolone resistance and mutational profile of *gyrA* in pulmonary MDR tuberculosis patients. *BMC Pulm Med.* 2020 May;20(1):1–6.
 192. Kranzer K, Kalsdorf B, Heyckendorf J, Andres S, Merker M, Hofmann-Thiel S, et al. New World Health Organization Treatment Recommendations for Multidrug-Resistant Tuberculosis: Are We Well Enough Prepared? *Am J Respir Crit Care Med.* 2019 Aug;200(4):514–5.
 193. Goig GA, Cancino-Muñoz I, Torres-Puente M, Villamayor LM, Navarro D, Borrás R, et al. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical samples for high-resolution genomic epidemiology and drug resistance surveillance: an observational study. *The Lancet Microbe.* 2020 Aug;1(4):e175–83.
 194. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update.
 195. **Chesov E**, Ciobanu N, Chesov D, Lange C, Heyckendorf J, Merker M, et al. ARTICOL ORIGINAL Rezistența *Mycobacterium tuberculosis* la Linezolid-mutații asociate și factori de risc: studiu transversal, retrospectiv, analitic Linezolid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*-associated mutations and risk factors: cross-sectional r. *MJHS.* 26(1):43.
 196. Singh B, Cocker D, Ryan H, Sloan DJ. Linezolid for drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar;2019(3).
 197. Azimi T, Khoshnood S, Asadi A, Heidary M, Mahmoudi H, Kaviar VH, et al. Linezolid resistance in multidrug-resistant *mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol.* 2022 Aug;13.
 198. Zhang Z, Pang Y, Wang Y, Liu C, Zhao Y. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with linezolid resistance in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in China. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Mar;43(3):231–5.
 199. Beckert P, Hillemann D, Kohl TA, Kalinowski J, Richter E, Niemann S, et al. *rplC* T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May;56(5):2743–5.
 200. Pi R, Liu Q, Jiang Q, Gao Q. Characterization of linezolid-resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* through WGS. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Jul;74(7):1795–8.

201. Beckert P, Hillemann D, Kohl TA, Kalinowski J, Richter E, Niemann S, et al. rplC T460C Identified as a Dominant Mutation in Linezolid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2743.
202. Wasserman S, Louw G, Ramangoela L, Barber G, Hayes C, Omar SV, et al. Linezolid resistance in patients with drug-resistant TB and treatment failure in South Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Aug 1;74(8):2377.
203. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *J Antimicrob Chemother*. 2020 Aug 1;75(8):2031–43.
204. Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Shi X, Niu H, et al. Mycobacterium tuberculosis Mutations Associated with Reduced Susceptibility to Linezolid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Apr;60(4):2542.
205. Sharma D, Bisht D. M. tuberculosis Hypothetical Proteins and Proteins of Unknown Function: Hope for Exploring Novel Resistance Mechanisms as well as Future Target of Drug Resistance. *Front Microbiol*. 2017 Mar 21;8(MAR):465.
206. Tornheim JA, Intini E, Gupta A, Udwardia ZF. Clinical features associated with linezolid resistance among multidrug resistant tuberculosis patients at a tertiary care hospital in Mumbai, India. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2020 Aug 1;20(Jul):100175.
207. Vengurlekar D, Walker C, Mahajan R, Dalal A, Chavan V, Galindo MA, et al. Linezolid resistance in patients with drug-resistant TB. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2023 Jul 1;27(7):567–9.
208. WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis, Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment.
209. Butov D, Lange C, Heyckendorf J, Kalmykova I, Butova T, Borovok N, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in the Kharkiv Region, Ukraine. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2020 May 1;24(5):485–91.
210. Farooq H, Cirillo D, Hillemann D, Wyllie D, van der Werf M, Ködmön C, et al. Limited Capability for Testing Mycobacterium tuberculosis for Susceptibility to New Drugs. *Emerg Infect Dis*. 2021 Mar 1;27(3):985–7.

Anexa 1 Mutații rezistente la medicamente în funcție de linia *Mycobacterium tuberculosis complex*

Medicamentul	Mutații	L2 %	L4 %	Ural %	L2 abs	L4 abs	Ural	p
H_geno	katG S315T	79	5,5	2,0	98	9	3	<0.0001
	katG S315T+fabG1-15c>t	10,5	92,1	95,3	13	151	141	<0.0001
	katG S315T+fabG1-17g>t	0,8	0,0	0,0	1	0	0	0.4306
	katG S315T+fabG1 L203L	8,9	2,4	2,7	11	4	4	0,0288
	inhA 194T+fabG1-15c>t	0,8	0,0	0,0	1	0	0	0.4306
H total		100	100,0	100,0	124	164	148	
R_geno	rpoB V170F	0,0	0,6	0,7	0	1	1	1.0000
	rpoB L430P	0,8	0,0	0,0	1	0		0.4306
	rpoB D435Y	0,0	2,4	2,7	0	4	4	0.1369
	rpoB D435Y+S450L	0,0	0,6	0,7	0	1	1	1.0000
	rpoB D435V	9,7	0,6	0,0	12	1	0	0.0002
	rpoB D435E + S441L	0,0	0,6	0,0	0	1	0	1.0000
	rpoB H445	3,2	7,3	4,1	4	12	6	0.1937
	rpoB S450L	84,7	84,8	89,9	105	139	133	1.0000
	rpoB S450W	0,0	1,8	1,4	0	3	2	0.2619
	rpoB S450L + L430P	1,6	0,0	0,0	2	0		0.1845
	rpoB S450L + S431T	0,0	1,2	0,7	0	2	1	0.5079
R total		100	100,0	100,0	124	164	148	
E_geno	embB M306I	23,5	13,6	12,3	20	9	7	0.1480
	embB M306V	37,6	19,7	19,3	32	13	11	0.0199
	embB M306V + embA 16c>t	0,0	6,1	7,0	0	4	4	0.0346
	embB M306I + embA up	4,7	0,0	0,0	4	0	0	0.1319
	embB D354A	3,5	0,0	0,0	3	0	0	0.2570
	embB D354A + embA 16c>a	1,2	0,0	0,0	1	0	0	1.0000
	embB G406	11,8	10,6	12,3	10	7	7	1.0000
	embB G406A + embA 16c>a	0,0	1,5	1,8	0	1	1	0.4371

Medicamentul	Mutații	L2 %	L4 %	Ural %	L2 abs	L4 abs	Ural	p
	embB Q497R	4,7	10,6	12,3	4	7	7	0.2122
	embB Q497R+12c>t	1,2	1,5	0,0	1	1		1.0000
	embA upstream	11,8	36,4	35,1	10	24	20	0.0004
E_total		100,0	100,0	100,0	85	66	57	
S_geno	rpsL K43R	76,6	1,2	0,0	95	2	0	<0,0001
	rpsL K88R	8,9	90,7	98,6	11	146	145	<0,0001
	rrs 514a>c	0,0	5,0	0,0	0	8	0	0.0107
	rrs 517c>t	14,5	0,0	0,0	18	0	0	<0,0001
	gid R158	0,0	0,6	0,7	0	1	1	1.0000
	gid 342 del c	0,0	0,6	0,0	0	1	0	1.0000
	gid 489 del a + K88R (rpsL)	0,0	0,6	0,7	0	1	1	1.0000
	gid 574 575del gg	0,0	1,2	0,0	0	2	0	0.5067
S_Total		100,0	100,0	100,0	124	161	147	
Eto_geno	ethA T61M	7,8	0,0	0,0	5	0	0	0.0019
	ethA Y147	17,2	0,0	0,0	11	0	0	<0,0001
	ethA W289	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	ethA T314I	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	ethA 110 del a	20,3	0,0	0,0	13	0	0	<0,0001
	ethA 246 ins t	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	ethA 341 del a	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	ethA 488 ins g	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	ethA 703 del t	3,1	0,0	0,0	2	0	0	0.0845
	ethA 1010 del t	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	ethA 1343 del a	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	inhA 7t>c	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
	fabG1 - 15c>t	20,3	97,4	97,2	13	151	141	<0,0001
	fabG1 - 15c>t + I194T (inhA)	1,6	0,0	0,0	1	0	0	0.2922
fabG1 L203L + ethA 768 del g	17,2	2,6	2,8	11	4	4	0.0003	

Medicamentul	Mutații	L2 %	L4 %	Ural %	L2 abs	L4 abs	Ural	p
Eto_total		100	100	100,0	64	155	145	
Lfx_geno	gyrA A90V	15,2	26,1	26,1	5	6	6	0.3305
	gyrA A90V+ D94A	3,0	0,0	0,0	1	0	0	1.0000
	gyrA S91P	3,0	13,0	13,0	1	3	3	0.2946
	gyrA D94	69,7	47,8	47,8	23	11	11	0.1637
	gyrA D94N + D94G	3,0	0,0	0,0	1	0	0	1.0000
	gyrA D94G + gyrB R446C	3,0	0,0	0,0	1	0	0	1.0000
	gyrB A504V + gyrA D94G	0,0	4,3	4,3	0	1	1	0.4107
	gyrB A504V	3,0	4,3	4,3	1	1	1	1.0000
	gyrB D461N	0,0	4,3	4,3	0	1	1	0.4107
Lfx_total		100	100	100,0	33	23	23	
Cm	rrs 1401a>g	84,6	50,0	0,0	11	1	0	0.3714
	rrs 1402c>t	15,4	0,0	0,0	2	0	0	1.0000
	rrs 1484g>t	0,0	50,0	100,0	0	1	1	0.1333
Cm_total		100,0	100,0	100,0	13	2	1	
Cs	ald 883 884del tt	14,3	0,0	0,0	1	0	0	0.4375
	ald 125 ins c	14,3	0,0	0,0	1	0	0	0.4375
	ald 903 ins c	14,3	0,0	0,0	1	0	0	0.4375
	ald 901 del a	0,0	33,3	33,3	0	3	3	0.2125
	ald 222 ins t	0,0	11,1	11,1	0	1	1	1.0000
	ald 460 del g	0,0	11,1	11,1	0	1	1	1.0000
	ald R279	28,6	0,0	0,0	2	0	0	0.1750
	alr D344N	0,0	33,3	33,3	0	3	3	0.2125
	alr Y388C	0,0	11,1	11,1	0	1	1	1.0000
	alr M343T	28,6	0,0	0,0	2	0	0	0.1750
Cs_total		100,0	100,0	100,0	7	9	9	
PAS	folC S150G	6,4	0,0	0,0	3	0	0	0.5645
	folC E40G	4,3	0,0	0,0	2	0	0	1.0000

Medicamentul	Mutații	L2 %	L4 %	Ural %	L2 abs	L4 abs	Ural	p
	folC E153A	0,0	6,3	16,7	0	1	1	0.2540
	folC I43T	4,3	0,0	0,0	2	0	0	1.0000
	thyA R222G	78,7	12,5	16,7	37	2	1	<0,0001
	ribD -12 c>t	6,4	81,3	66,7	3	13	4	<0,0001
Pas_total		100,0	100,0	100,0	47	16	6	
	rrs 1401a>g	42,3	50,0	0,0	11	1	0	1.0000
	rrs 1402c>t	7,7	0,0	0,0	2	0	0	1.0000
	rrs 1484g>t	0,0	50,0	100,0	0	1	1	0.0714
Am	eis -14c>t	50,0	0,0	0,0	13	0	0	0.4841
Am_total		100,0	100,0	100,0	26	2	1	
	rrs 1401a>g	24,4	0,7	0,0	10	1	0	<0,0001
	rrs 1402c>t	4,9	0,0	0,0	2	0	0	0.0466
	rrs 1484g>t + eis -12c>t	0,0	0,7	0,7	0	1	1	1.0000
	rrs 1401a>g + eis -12c>t	2,4	0,0	0,0	1	0	0	0.2181
	eis -14c>t	31,7	0,0	0,0	13	0	0	<0,0001
	eis -12c>t	14,6	96,6	98,6	6	142	140	<0,0001
	eis -37g>t	7,3	0,0	0,0	3	0	0	0.0098
Km	eis -10g>a	14,6	2,0	0,7	6	3	1	0.0039
Km_total		100,0	100,0	100,0	41	147	142	

Anexa 2 Caracteristicile locilor homoplazici

Nr. minim modificări în arborele filogenetic	Poziția genom	Ref	Baz a mutată	Gena (Rv)	Gena Nume	Tipul	Mutația în ADN	Mutația în proteină	Rezistența la medicamente pentru TB	Poziția Start	Poziția Stop	Direcția de citire	Categoria funcțională	Total	L2	L4
3	6579	C	T	Rv0005	gyrB	CDS	1340c>t	S447F (tcc/tTc)	moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, levofloxacin	5240	7267	+	Information pathways	3	1	2
3	6750	C	T	Rv0005	gyrB	CDS	1511c>t	A504V (gcg/gTg)	moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, levofloxacin	5240	7267	+	Information pathways	3	1	2
10	7570	C	T	Rv0006	gyrA	CDS	269c>t	A90V (gcg/gTg)	moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, levofloxacin	7302	9818	+	Information pathways	11	5	6
3	7572	T	C	Rv0006	gyrA	CDS	271t>c	S91P (tcg/Ccg)	moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, levofloxacin	7302	9818	+	Information pathways	4	1	3
12	7581	G	T	Rv0006	gyrA	CDS	280g>t	D94Y (gac/Tac)	moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, levofloxacin	7302	9818	+	Information pathways	14	8	6
18	7582	A	C	Rv0006	gyrA	CDS	281a>c	D94A (gac/gCc)	moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, levofloxacin	7302	9818	+	Information pathways	23	18	5
2	8164	C	A	Rv0006	gyrA	CDS	863c>a	A288D (gcc/gAc)	moxifloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, levofloxacin	7302	9818	+	Information pathways	2	0	2
2	122353	A	G	Rv0104	Rv0104	CDS	37a>g	I13V (atc/Gtc)	likely benign	122317	123831	+	conserved hypotheticals	9	9	0

Nr. minim modificări în arborele filogenetic	Poziția genom	Ref	Baza mutantă	Gena (Rv)	Gena Nume	Tipul	Mutația în ADN	Mutația în proteină	Rezistența la medicamente pentru TB	Poziția Start	Poziția Stop	Direcția de citire	Categoria funcțională	Total	L2	L4
6	761110	A	T	Rv0667	rpoB	CDS	1304a>t	D435V (gac/gTc)	rifampicin, rifabutin	759807	763325	+	information pathways	13	12	1
2	761138	C	G	Rv0667	rpoB	CDS	1332c>g	T444T (acc/acG)	compensates for rpoB mutations	759807	763325	+	information pathways	2	1	1
7	761139	C	A	Rv0667	rpoB	CDS	1333c>a	H445N (cac/Aac)	rifampicin, rifabutin	759807	763325	+	information pathways	12	4	8
5	761140	A	T	Rv0667	rpoB	CDS	1334a>t	H445L (cac/cTc)	rifampicin, rifabutin	759807	763325	+	information pathways	6	1	5
2	761142	A	C	Rv0667	rpoB	CDS	1336a>c	K446Q (aag/Cag)	rifampicin, rifabutin	759807	763325	+	information pathways	2	1	1
16	761155	C	T	Rv0667	rpoB	CDS	1349c>t	S450L (tcg/tTg)	rifampicin, rifabutin	759807	763325	+	information pathways	248	106	142
2	762285	C	T	Rv0667	rpoB	CDS	2479c>t	R827C (cgc/Tgc)	compensates for rpoB mutations	759807	763325	+	information pathways	3	3	0
13	764817	T	G/C	Rv0668	rpoC	CDS	1448t>g /1448t>c;	V483G (gtg/gGg)/V483A (gtg/gCg)	compensates for rpoB mutations	763370	767320	+	information pathways	134	15	119
7	764840	A	G	Rv0668	rpoC	CDS	1471a>g	I491V (atc/Gtc)	compensates for rpoB mutations	763370	767320	+	information pathways	21	20	1
3	764916	T	C	Rv0668	rpoC	CDS	1547t>c	L516P (ctg/cCg)	compensates for rpoB mutations	763370	767320	+	information pathways	3	3	0
5	781687	A	G	Rv0682	rpsL	CDS	128a>g	K43R (aag/aGg)	streptomycin	781560	781934	+	information pathways	96	95	1
6	781822	A	G	Rv0682	rpsL	CDS	263a>g	K88R (aag/aGg)	streptomycin	781560	781934	+	information pathways	158	11	147
2	851151	C	T	Rv0756c	Rv0756c	CDS	316g>a	G106S (ggc/Agc)	likely benign	850741	851466	-	conserved hypotheticals	10	10	0
2	1253207	A	G	Rv1129c	Rv1129c	CDS	1328t>c	I443T (atc/aCc)	likely benign	1253074	1254534	-	regulatory proteins	2	2	0
2	1253471	T	C	Rv1129c	Rv1129c	CDS	1064a>g	H355R (cac/cGc)	likely benign	1253074	1254534	-	regulatory proteins	2	2	0

Nr. minim modificări în arborele filogenetic	Poziția genom	Ref	Baza mutantă	Gena (Rv)	Gena Nume	Tipul	Mutația în ADN	Mutația în proteină	Rezistența la medicamente pentru TB	Poziția Start	Poziția Stop	Direcția de citire	Categoria funcțională	Total	L2	L4
2	1265070	G	T	Rv1137c	Rv1137c	intergenic 3'	-385c>a	-	likely benign	1265087	1265455	-	conserved hypotheticals	120	120	0
2	1296834	A	C	Rv1166	lpqW	CDS	683a>c	E228A (gaa/gCa)	likely benign	1296152	1298059	+	cell wall and cell processes	20	20	0
2	1303095	G	A	Rv1173	fbiC	CDS	165g>a	L55L (ctg/ctA)	likely benign	1302931	1305501	+	intermediary metabolism and respiration	10	0	10
8	1673425	C	T	Rv1483	fabG1	INT	-15c>t	-	INH-R#,ETH-R	1673440	1674183	+	lipid metabolism	164	14	150
2	1674048	G	A	Rv1483	fabG1	CDS	609g>a	L203L (ctg/ctA)	isoniazid, ethionamide, prothionamide	1673440	1674183	+	lipid metabolism	15	11	4
2	1924180	A	G	Rv1699	pyrG	CDS	352a>g	T118A (acc/Gcc)	likely benign	1923829	1925589	+	intermediary metabolism and respiration	3	0	3
2	1924388	C	T	Rv1699	pyrG	CDS	560c>t	S187L (tcg/tTg)	likely benign	1923829	1925589	+	intermediary metabolism and respiration	2	0	2
2	2124911	T	C	Rv1876	bfrA	upstream intergenic region	-429t>c	-	likely benign	2125340	2125819	+	intermediary metabolism and respiration	3	2	1
3	2155168	G	C	Rv1908c	katG	CDS	1280c>g	S315T (agc/aCc)	isoniazid	2153889	2156111	-	virulence, detoxification, adaptation	285	123	162
2	2295685	C	A	Rv2048c	pks12	CDS	11302g>t	V3768L (gtg/Ttg)	likely benign	2294531	2306986	-	lipid metabolism	122	122	0
2	2338866	T	G	Rv2082	Rv2082	CDS	158t>g	L53R (ctg/cGg)	likely benign	2338709	2340874	+	conserved hypotheticals	149	0	149
3	2338994	G	A	Rv2082	-	CDS	286g>a	A96T (gcg/Acg)	-	2338709	2340874	+	conserved hypotheticals	150	0	150
4	2626600	G	A	Rv2347c	esxP	INT	-81c>t	-	likely benign	2626223	2626519	-	cell wall and cell processes	5	1	4

Nr. minim modificări în arborele filogenetic	Poziția genom	Ref	Baza mutantă	Gena (Rv)	Gena Numere	Tipul	Mutația în ADN	Mutația în proteină	Rezistența la medicamente pentru TB	Poziția Start	Poziția Stop	Direcția de citire	Categoria funcțională	Total	L2	L4
6	2715 342	C	T	Rv24 16c	eis	INT	-10g>a	-	KAN-R	2714 124	2715 332	-	virulence, detoxification, adaptation	8	6	2
7	2715 344	G	A	Rv24 16c	eis	INT	-12c>t	-	KAN-R	2714 124	2715 332	-	virulence, detoxification, adaptation	149	7	142
2	2715 346	G	A	Rv24 16c	eis	INT	-14c>t	-	KAN-R,AMI-R#	2714 124	2715 332	-	virulence, detoxification, adaptation	13	13	0
2	2715 369	C	A	Rv24 16c	eis	INT	-37g>t	-	KAN-R#	2714 124	2715 332	-	virulence, detoxification, adaptation	3	3	0
2	2747 151	T	C	Rv24 47c	folC	CDS	448a>g	S150G (agc/Ggc)	PAS-R	2746 135	2747 598	-	intermediary metabolism and respiration	3	3	0
2	2747 471	A	G	Rv24 47c	folC	CDS	128t>c	I43T (atc/aCc)	PAS-R	2746 135	2747 598	-	intermediary metabolism and respiration	2	2	0
2	2747 480	T	C	Rv24 47c	folC	CDS	119a>g	E40G (gag/gGg)	PAS-R	2746 135	2747 598	-	intermediary metabolism and respiration	2	2	0
2	2945 004	C	G	Rv26 16	Rv26 16	INT	-326c>g	-	likely benign	2945 330	2945 830	+	conserved hypotheticals	11	0	11
2	2945 167	G	T	Rv26 16	Rv26 16	INT	-163g>t	-	likely benign	2945 330	2945 830	+	conserved hypotheticals	3	0	3
5	2986 827	G	A	Rv26 70c	Rv26 70c	CDS	14c>t	A5V (gca/gTa)	PAS-R	2985 731	2986 840	-	conserved hypotheticals	16	3	13
2	3067 961	G	A	Rv27 54c	thyX	INT	-16c>t	-	compensates for ThyA deficit	3067 193	3067 945	-	intermediary metabolism and respiration	36	36	0
2	3135 912	G	C	Rv28 28c	Rv28 28c	CDS	422c>g	T141R (acg/aGg)	likely benign	3135 788	3136 333	-	conserved hypotheticals	122	121	1

Nr. minim modificări în arborele filogenetic	Poziția genom	Ref	Baza mutată	Gena (Rv)	Gena Nume	Tipul	Mutația în ADN	Mutația în proteină	Rezistența la medicamente pentru TB	Poziția Start	Poziția Stop	Direcția de citire	Categoria funcțională	Total	L2	L4
2	3136-335	G	A	Rv28-28A	Rv28-28A	CDS	265c>t	R89W (cgg/Tgg)	likely benign	3136-330	3136-599	-	conserved hypotheticals	2	0	2
4	3336-587	T	A	Rv29-81c	ddlA	INT	-1331a>t	-	likely benign	3336-796	3337-917	-	cell wall and cell processes	158	0	158
4	3482-717	A	G	Rv31-16	moeB-2	INT	-59a>g	-	likely benign	3482-776	3483-945	+	intermediary metabolism and respiration	83	83	0
2	3568-736	A	C	Rv31-97A	whiB-7	INT	-57t>g	-	likely benign	3568-401	3568-679	-	regulatory proteins	3	3	0
3	3568-795	T	C	Rv31-97A	whiB-7	INT	-116a>g	-	likely benign	3568-401	3568-679	-	regulatory proteins	3	3	0
2	3840-391	C	T	Rv34-23c	alr	CDS	1030g>a	D344N (gac/Aac)	CS-R	3840-194	3841-420	-	intermediary metabolism and respiration	3	0	3
2	3840-393	A	G	Rv34-23c	alr	CDS	1028t>c	M343T (atg/aCg)	CS-R	3840-194	3841-420	-	intermediary metabolism and respiration	2	2	0
2	3877-960	A	G	Rv34-57c	rpoA	CDS	548t>c	V183A (gtc/gCc)	compensates for rpoB mutations	3877-464	3878-507	-	information pathways	2	2	0
8	4243-217	C	T/A/G	Rv37-94	embA	INT	-16c>t;-16c>a;-16c>6	-	EMB-R#	4243-233	4246-517	+	cell wall and cell processes	28	4	24
7	4243-221	C	T	Rv37-94	embA	INT	-12c>t	-	EMB-R#	4243-233	4246-517	+	cell wall and cell processes	12	9	3
2	4245-227	C	T	Rv37-94	embA	CDS	1995c>t	H665H (cac/caT)	ethambutol	4243-233	4246-517	+	cell wall and cell processes	2	2	0
22	4247-429	A	G	Rv37-95	embB	CDS	916a>g	M306V (atg/Gtg)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	50	46	4
15	4247-431	G	T	Rv37-95	embB	CDS	918g>t	M306I (atg/atT)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	31	24	7
2	4247-469	A	C	Rv37-95	embB	CDS	956a>c	Y319S (tat/tCt)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	2	1	1

Nr. minim modificări în arborele filogenetic	Poziția genom	Ref	Baza mutantă	Gena (Rv)	Gena Nume	Tipul	Mutația în ADN	Mutația în proteină	Rezistența la medicamente pentru TB	Poziția Start	Poziția Stop	Direcția de citire	Categoria funcțională	Total	L2	L4
4	4247-574	A	C	Rv3795	embB	CDS	1061a>c	D354A (gac/gCc)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	4	4	0
4	4247-729	G	T	Rv3795	embB	CDS	1216g>t	G406C (ggc/Tgc)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	4	4	0
8	4247-730	G	C	Rv3795	embB	CDS	1217g>c	G406A (ggc/gCc)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	16	9	7
7	4248-003	A	G	Rv3795	embB	CDS	1490a>g	Q497R (cag/cGg)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	11	4	7
3	4249-583	G	A	Rv3795	embB	CDS	3070g>a	D1024N (gac/Aac)	ethambutol	4246-514	4249-810	+	cell wall and cell processes	5	1	4
2	4269-089	C	T	Rv3806c	ubiA	CDS	745g>a	A249T (gcg/Acg)	likely benign	4268-925	4269-833	-	cell wall and cell processes	2	2	0
2	4269-296	T	C	Rv3806c	ubiA	CDS	538a>g	M180V (atg/Gtg)	likely benign	4268-925	4269-833	-	cell wall and cell processes	2	1	1
2	4338-365	A	C	Rv3862c	whiB6	CDS	157t>g	C53G (tgc/Ggc)	likely benign	4338-171	4338-521	-	regulatory proteins	2	2	0

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)**
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163445323005327>
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)**
<https://erj.ersjournals.com/content/59/3/2100621.long>
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)**
<https://erj.ersjournals.com/content/57/6/2002544.long>

- **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.
<https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/19383>
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.
<https://old.asm.md/administrator/fisiere/editii/f59.pdf>

- **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.
https://theunion.org/sites/default/files/2022-11/Abstract_Book_2022-compressed.pdf
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
http://repositsc.nuczu.edu.ua/bitstream/123456789/12901/1/Sierikova_Strelnikova_Kryutchenko_Baku_2_2021.pdf
3. Chesov, D., Heyckendorf, J., Rusu, D., Munteanu, O., **Chesov, E.**, Cozlovschi, 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.
https://erj.ersjournals.com/content/56/suppl_64/530

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.

https://erj.ersjournals.com/content/56/suppl_64/474

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.

https://erj.ersjournals.com/content/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.

<https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/25675>

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.

<https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24567>

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.

<https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/18941>

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.

<https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/14593>

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.

<https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/11234>

- **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 Testemitanu”*. 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 Spirologie*. 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 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.

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, Elena Chesov declar pe răspundere personală, că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Chesov Elena

Semnătura:

Data: 26.08.2024



Declaration on accountability

I declare the personal responsibility that information presented in this thesis are the result of my own research and scientific achievements. I realize that, otherwise, will suffer the consequences in accordance with law.

Chesov Elena

Signature

Date: 26.08.2024



Déclaration sur la responsabilité

Je déclare la responsabilité personnelle que les informations présentées dans cette thèse sont le résultat de mes propres recherches et réalisations scientifiques. Je me rends compte que, sinon, en subiront les conséquences conformément à la loi.

Chesov Elena

Signature:

Date: 26.08.2024





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. **6186**

Pentru inovația cu titlul

**TESTAREA FENOTIPICĂ A SENSIBILITĂȚII
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS LA LINEZOLID CU
APLICAREA DILUȚIILOR SERIALE DE ANTIBIOTIC**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**CHESOV Elena, CIOBANU Nelly,
RUSU Doina, CRUDU Valeriu**



13 Februarie 2024

[Signature]
(Semnătura autorizată)



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. **6187**

Pentru inovația cu titlul

**TESTAREA FENOTIPICĂ A SENSIBILITĂȚII
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS LA BEQUILINĂ
CU APLICAREA DILUȚIILOR SERIALE DE
ANTIBIOTIC**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**CHESOV Elena, CIOBANU Nelly,
RUSU Doina, CRUDU Valeriu**



Data eliberării **13 Februarie 2024**


(Semnătura autorizată)





APROB

Profesor pentru activitate de cercetare,
"SMF, Nicolae Testemițanu" din RM
academician al ASM,
prof. univ. dr. hab. șt. med.



Stanislav GROPPA

2024

ACTUL nr. 29
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico – practic)

Denumirea ofertei pentru implementare: „TESTAREA FENOTIPICĂ A SENSIBILITĂȚII MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS LA LINEZOLID CU APLICAREA DILUȚILOR SERIALE DE ANTIBIOTIC”.

1. **Autori:** Elena Chesov, Nelly Ciobanu, Doina Rusu, Valeriu Crudu.
2. **Numărul inovației:** Nr.6188 din 13 februarie 2024.
3. **Unde și când a fost implementată:** IMSP Insititul de fiziopneumologie "Chiril Draganiuc", pe perioada anului 2019-2024.
4. **Eficacitatea implementării:** Metoda testării sensibilității la linezolid pe diluții seriale permite individualizarea tratamentul bolnavilor prin selectarea unei doze alternative de medicament la bolnavii cu tulpini cu rezistență genotipică sau rezistență fenotipică la doza standard precum și la cei cu reacții adverse față de acest medicament.
5. **Rezultatul implementării:** Oferă metodologia testării în scopuri clinice sau de cercetare a sensibilității *M. tuberculosis* la linezolid pe diverse concentrații altele decât cele standard (0,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, $\geq 2,5$ mg/ml).

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef departament, Departamentul Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena Raevschi

Director Institutul
de fiziopneumologie "Chiril Draganiuc"

Doina Rusu



APROB
Președinte pentru activitate de cercetare,
IME "Nicolae Testemițanu" din RM
Academia Științelor AȘM,
prof. univ. dr. hab. șt. med.
Stanislav GROPPA
"17 februarie 2024"

ACTUL nr. 28
DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico – practic)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: „TESTAREA FENOTIPICĂ A SENSIBILITĂȚII MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS LA BEDAQUILINĂ CU APLICAREA DILUȚIILOR SERIALE DE ANTIBIOTIC.

2. Autori: Elena Chesov, Nelly Ciobanu, Doina Rusu, Valeriu Crudu.

3. Numărul inovației: Nr. 6187 din 13 februarie 2024.

4. Unde și când a fost implementată: IMSP Institutul de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc", pe perioada anului 2019-2024.

5. Eficacitatea implementării: Metoda testării sensibilității la bedaquilină pe diluții seriale permite individualizarea tratamentului bolnavilor prin selectarea unei doze alternative de medicament la bolnavii cu tulpini cu rezistență genotipică sau rezistență fenotipică la doza standard precum și la cei cu reacții adverse față de acest medicament.

6. Rezultatul implementării: Oferă metodologia testării în scopuri clinice sau de cercetare a sensibilității *M. tuberculosis* la bedaquilină pe diverse concentrații altele decât cele standard (0,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, $\geq 2,5$ mg/ml).

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.

Șef departament, Departamentul Cercetare,
dr. hab. șt. med., conf. univ.

Elena Raevschi

Director Institutul
de Ftiziopneumologie "Chiril Draganiuc"

Doina Rusu



UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMITANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA

hr

ANUL DE LA ÎNFIINȚARE

DIPLOMĂ DE ONOARE

Se decernează

Dnei Elena Chesov

*asistent universitar, studentă-doctorandă,
Catedra de biologie moleculară și genetica umană*

**LAUREAT AL CONCURSULUI
„IMPACTUL ACTIVITĂȚII DE CERCETARE”**



Rector

Emil Ceban
Emil Ceban,
profesor universitar, dr. hab. șt. med.,
președinte al Comitetului
organizatoric al Conferinței

Prorector pentru activitate
de cercetare

Stanislav Groppa
Stanislav Groppa,
profesor universitar, dr. hab. șt. med.,
academician al AȘM,
președinte al Biroului Comitetului
științific al Conferinței

CURRICULUM VITAE

Informații personale

Nume / Prenume **CHESOV ELENA**
Adresă Chișinău, R. Moldova
Telefon +37369771415
E-mail elena.chesov@usmf.md
Cetățenie Republica Moldova
Data nașterii 03.07.1987



Experiența profesională

2014 - prezent Asistent universitar, catedra Biologie moleculară și Genetică umană, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, RM.
2019-2022 Cercetător științific Laboratorul Clinica Bolilor infectioase, Centrul de cercetări Borstel, Germania.
2018-2020 Cercetător științific Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei. Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Drăganiuc”, Chișinău, RM.
2013 – 2014 Medic microbiolog, Laboratorul Centrului Epidemiologia Bolilor Extrem de Contagioase și Securitate Biologică din cadrul Centrului Național de Sănătate Publică, Chișinău, RM.
2012 – 2013 Felcer – laborant, Laboratorul Centrului Epidemiologia Bolilor Extrem de Contagioase și Securitate Biologică din cadrul Centrului Național de Sănătate Publică, Chișinău, RM.
25.09.2013 – 09.11.2013 Laborant în cadrul studiului național al factorilor de risc pentru bolile netransmisibile STEPS, RM.
2008 – 2012 Asistent al medicului în Promovarea Sănătății, Centrul Promovarea Sănătății și Comunicare din cadrul Centrului Național de Sănătate Publică, Chișinău, RM
23.04.12 – 30.06.12 Operator Introducerea datelor în programul MICS-CSPro (Studiul de Indicatori Multipli în Cuiburi, MICS4), Republica Moldova.

Educație și formare

2017-2022 Studii doctorale în științe medicale programul de doctorat 313.02 – Microbiologie, Virusologie medicală, disciplina Microbiologie și Imunologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, RM.
2012-2014 Rezidențiat, specialitatea Microbiologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, RM.
2006-2012 Facultatea Sănătate Publică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, RM.

Stagieri

1-30 iunie 2023 Stagiul de specializare în cadrul Disciplinei de genetică Universitatea de Medicină și Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu Mureș.
2020-2022 Studii de recalificare, specialitatea „Logopedie” Institutul de Formare Continuă, Chișinău, RM.
13.01.2019-13.03.2019 INOVA4TB - Early Stage Researcher Institutul German Trial I Pujol (IGTP), Barcelona.
09-27 martie 2015 Ciclu de perfecționare „Psihopedagogia învățământului superior”. Chișinău, RM.

- 17.12.2011-17.02.2012 Cursuri contabilitate, Programa Contabilă 1C vers 7.7 (S.R.L. VIOSALM)
- 2010 Cursuri de instruire pentru activitatea practică – acordarea asistenței medicale primare bolnavilor de gripă provocată de virusul gripal nou A (H1N1) în eventuala pandemie
- 2005 Cursul de însușire a computerului, Centrul Moldo - American pentru Inițiativă Privată, Academia de Studii Economice

Participări în proiecte științifice

- 2018-2020** Medic microbiolog
CARE common action against HIV/ TB/HCV across the regions of Europe CARE.
- 2015-2022** Cercetător stagiar
Inova4TB under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 823854.

Participări la manifestări științifice

- 20 – 21 decembrie 2023 Conferință științifică națională cu participare internațională „Noi abordări în controlul bolilor respiratorii. Integrarea serviciilor”, Chișinău, Republica Moldova.
- 23-24 noiembrie 2023 Conferința națională cu participare internațională Abordarea o singură sănătate-realizări și provocări, ediția a II-a, Chișinău.
- 8-11 Nov 2022 The Union, World Conference on Lung Health 2022. Combating pandemics: Today and Tomorrow.
- 19-21 octombrie 2022 Conferința științifică anuală, Cercetarea în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță, USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău.
- 2-4 mai 2021 Al-Farabi congress on applied sciences - II 'Nakhchivan' University, Azerbaijan.
- 20 – 22 ianuarie 2020 2 nd International Tuberculosis Training Course University of Namibia School of Medicine and Katutura State Hospital Windhoek / Namibia.
- 12-15 mai 2019 TBnet Academy, București.
- 18 iunie 2019 Innovation in Tuberculosis Management - Research Symposium, Odesa.
- 15-19 septembrie 2018 Congresul Internațional al Societății de Spirologie, Paris.
- 3-5 mai 2018 MedEspera 2018 The 7th International Medical Congress for Students and Young Doctors. Chișinău.
- 18-21 octombrie 2017 Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților
- 18 decembrie 2013 Participarea la cursul de instruire „Sporirea rolului pacientului și a comunității în controlul tuberculozei în Moldova ”, Centrul pentru Politici și Analize în Sănătate, Chișinău, RM
- 17-20 noiembrie 2013 Participarea la simpozionul “M/XDR-Tuberculosis 2013” Borstel, Germania
- 13.05.2011 Conferința Națională a Asistenților Medicali „Rolul asistenților medicali în furnizarea serviciilor de asistență medicală de calitate, echitabile și accesibile tuturor”, RM
- 19-21.05.2010 International Medical Congres for Students and Young Doctors „MedEspera 2010”, Chisinau, Republic of Moldova

Publicații articole/abstracte

Au fost publicate 15 lucrări științifice, inclusiv 3 articole în revistele din bazele de date Web of Science, 2 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, 10 teze în lucrările conferințelor științifice internaționale și naționale, 8 participări cu comunicare națională și internațională, 4 participări cu poster la foruri științifice internaționale. Două certificate de inovație și două acte de implementare.

Cărți pentru copii

2018 Poveștile lui Albinuț: Pentru copilași drăguți (2 ediții, tiraj 1300, tipografia Policolor), RM.

Apartenență la societăți/asociații științifice naționale și internaționale

2019-2022 European Respiratory Society
 2022-2024 TBNET – Tuberculosis European Trial Group
 2023-2024 International Union Against tuberculosis and Lung Diseases
 2017-prezent Federation of European Biochemical Societies
 2018-2022 Federation of European Microbiological Societies

Premii, mențiuni, distincții, titluri onorifice

21 octombrie 2021 Laureata concursului „IMPACTUL ACTIVITĂȚII DE CERCETARE” Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, RM.

Aptitudini și competențe

Limba(i) maternă(e) Română

Limba(i) străină(e)

cunoscută(e)

	Înțelegere	Vorbire	Scriere
	B2	B2	B2
Limba engleza	C1	B2	B1
Limba rusă	B1	B1	A2

Limba franceză

Competențe digitale Operarea la nivel avansat: OS Windows, MS OFFICE, SPSS