

C.Z.U.: 616.24-002.5; 616.24-002.5+616-097, 616-078, 616-079
<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2022.3-74.33>

ANALIZA GEOGRAFICĂ ŞI EVALUAREA SECVENȚIERII GENOMULUI *M. TUBERCULOSIS* LA NIVEL NAȚIONAL

Valeriu CRUDU, dr. în şt. med., conf. cercet.,

Alexandru CODREANU, cercet. şt.,

Sofia ALEXANDRU, master în managementul sănătăţii publice,

Valentina VILC, master în managementul sănătăţii publice,

Ana DONICA, master în managementul sănătăţii publice,

Elena TUDOR, dr. în şt. med., conf. cercet., membru cor. al AŞMM,

Nadejda ȚURCAN, cercet. şt.,

Nelly CIOBANU, cercet. şt.

IMSP Institutul de Ftiziopneumologie “Chiril Draganiuc”

email – valeriu.crudu@gmail.com

Rezumat.

Tuberculoza, una dintre infecțiile antice care afectează în deosebi oamenii, principalul organ țintă al acestei boli fiind plămânu, este cauzată de *M. tuberculosis* și rămâne una dintre cele mai importante probleme de sănătate publică, în special în țările în curs de dezvoltare. Apariția tuberculozei cu rezistență multiplă și cu rezistență extinsă la medicamente este considerată o amenințare serioasă pentru controlul tuberculozei la nivel mondial. Povara tuberculozei rezistente la medicamente rămâne în creștere în țările endemice pentru această infecție. Factorii de risc care influențează această situație și care sunt elucidați mai frecvent în literatura de specialitate sunt utilizarea abuzivă a medicamentelor, eșecul regimului terapeutic, recidiva tuberculozei, dificultatea de a obține testarea sensibilității la medicamente în timp rapid. În Moldova, dar și în alte regiuni din Europa de Est, rezistența la medicamentele reprezintă un obstacol serios în controlul eficient al acestei boli. Există dovezi că transmiterea tulpinilor rezistente, spre deosebire de dobândirea de mutații de rezistență prin tratamentul inadecvat al tuberculozei sensibile la medicamente, este principalul motor al nivelului înalt al tuberculozei cu rezistență multiplă și cu rezistență extinsă la medicamente în aceste țări.

Cuvinte cheie: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculoza cu rezistență multiplă; tuberculoza cu rezistență extinsă la medicamente; testarea sensibilității către medicamente, metode moleculare genetice

Summary. Geographical analysis and evaluation of *M. tuberculosis* genome sequencing at the national level.

Tuberculosis, one of the ancient infections that especially affects humans, the main target organ of this disease being the lung, is caused by *M. tuberculosis* and remains one of the most important public health problems, especially in developing countries. The emergence of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis is considered a serious threat to tuberculosis control worldwide. The burden of drug-resistant tuberculosis remains increasing in countries endemic for this infection. The risk factors that influence this situation and that are elucidated more frequently in the specialized literature are the abusive use of drugs, the failure of the therapeutic regimen, the relapse of tuberculosis, the difficulty of obtaining drug sensitivity testing in a fast time. In Moldova, but also in other regions of Eastern Europe, drug resistance represents a serious obstacle in the effective control of this disease. There is evidence that the transmission of resistant strains, as opposed to the acquisition of resistance mutations through inadequate treatment of drug-susceptible tuberculosis, is the main driver of the high level of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in these countries.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, multidrug-resistant tuberculosis; tuberculosis with extensive drug resistance; drug sensitivity testing, molecular genetic methods.

Резюме: Географический анализ и оценка секвенирования генома *M. tuberculosis* на национальном уровне.

Туберкулез, одна из древних инфекций, особенно поражающая людей, главным органом-мишенью которой являются легкие, вызывается *M. tuberculosis* и остается одной из важнейших проблем общественного здравоохранения, особенно в развивающихся странах. Появление туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью считается серьезной угрозой борьбе с туберкулезом во всем мире. Бремя устойчивого туберкулеза продолжает увеличиваться в странах, эндемичных по этой инфекции. Факторами риска, влияющими на эту ситуацию и чаще освещаемыми в специальной литературе, являются злоупотребление лекарственными средствами, неэффективность терапевтического режима, рецидив туберкулеза, сложность проведения теста на лекарственную чувствительность в короткие сроки. В Молдове, а также в других регионах Восточной Европы лекарственная устойчивость представляет собой серьезное препятствие для эффективной борьбы с этим заболеванием. Имеются данные о том, что передача резистентных штаммов, в отличие от приобретения резистентных мутаций в результате неадекватного лечения чувствительного туберкулеза, является основной причиной высокого уровня резистентного туберкулеза в этих странах.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью; туберкулез с широкой устойчивостью; определение чувствительности.

Introducere.

Pentru cea mai mare parte a populației planetei tuberculoza (TB) rămâne a fi și astăzi un pericol de sănătate publică, fiind o boală cu o morbiditate și o letalitate ridicată. Suferințele pricinuite populației de către *M.tuberculosis* sunt extrem de mari.

Tuberculoza cu rezistență multiplă (TB MDR) și cu rezistență extinsă (TB XDR) la medicamente reprezintă amenințări serioase pentru controlul eficient al tuberculozei în multe țări. Conform datelor recente a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), în 2021, proporția estimată a persoanelor cu TB care au avut MDR/RR-TB a fost de 3,6% (2,7–4,4%) în rândul cazurilor noi și 18% (11–26%) în rândul celor tratați anterior; cifrele în 2015 au fost de 3,9% (2,8–5,0%) și, respectiv, 20% (9,5–31%). Trei țări au reprezentat 42% din cazurile globale în 2021: India (26%), Federația Rusă (8,5%) și Pakistan (7,9%). Cele mai mari proporții (>50% din cazurile tratate anterior cu MDR/RR-TB) se găsesc în Federația Rusă și în mai multe țări în Europa de Est și Asia Centrală (1, 2, 3).

MDR-TB și XDR-TB devin o problemă de continuă îngrijorare și o provocare serioasă pentru programele de control al TB și pentru Moldova. Cauzele posibile ale rezistenței la medicamente includ mai mulți factori, precum: defecțiunile infrastructurii de sănătate publică, transmiterea tuberculozei în spitale și închisori și unei deteriorări a condițiilor de viață care coincide cu dizolvarea Uniunii Sovietice la începutul anilor 1990(3, 4, 5, 6).

În timp ce contribuțiile acestor factori rămân incerte, există un consens că transmiterea MDR-TB, spre deosebire de rezistența dobândită prin tratamentul inadecvat al TB susceptibilă la medicamente, este acum mecanismul predominant al prevalenței înalte a MDR-TB (7, 8, 9). Acest consens este susținut de datele de supraveghere de rutină care documentează faptul că majoritatea episoadelor incidente de TB-MDR apar în rândul persoanelor fără tratament anti-TB anterior (1, 9, 10). Cu toate acestea, aceste date singure nu abordează întrebările esențiale despre unde și între cine se transmite TB-MDR. sau dezvăluie măsura în care variantele specifice de *M. tuberculosis* sunt responsabile de transmiterea MDR-TB.

Disponibilitatea tot mai mare a metodelor de secvențiere, împreună cu dezvoltarea abordărilor analitice pentru integrarea datelor genomice, spațiale și epidemiologice de înaltă rezoluție, a transformat capacitatea noastră de a descrie transmiterea agenților patogeni în populații(11, 12, 13, 14). Studiile genomice anterioare ale *M. tuberculosis* din aceste regiuni au descris apariția și evoluția unor linii specifice responsabile pentru o proporție exagerată de TB MDR în aceste țări (15, 16, 17, 18).

Material și Metode.

Am efectuat o analiză retrospectivă și prospectivă, genomică a cazurilor de TB cu cultură pozitivă diagnosticate pe parcursul a 10 ani (2010-2019) în Republica Moldova pentru a studia distribuția și transmiterea *Mycobacterium tuberculosis* în întreaga țară. Pentru studiul retrospectiv au fost utilizate tulpinile de *M.tuberculosis* izolate de la pacienții cu tuberculoză din diferite teritorii a republicii în perioada 2010-2017 și păstrate în Banca Națională a *M.tuberculosis* (BNM) din Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei (LNR) a Institutului de Ftiziopneumologie “Chiril Draganiuc”. Pentru studiul prospectiv am colectat și secvențiat izolatele diagnostice inițiale din toate cazurile de TB cu cultură pozitivă care au apărut pe parcursul a doi ani (2018-2010) în Republica Moldova. Pe lângă capturarea izolatelor de *M. tuberculosis* din toate cazurile cu cultură pozitivă, am colectat și date despre locația domiciliului și alte date demografice și epidemiologice, permițându-ne să studiem distribuția și dinamica TB în întreaga țară. Pentru studiul prospectiv adăugător au fost utilizate metode genetice pentru a identifica grupuri presupuse de transmitere și au fost analizate datele geografice și demografice pentru a descrie în continuare transmiterea locală a tulpinilor de *M. tuberculosis*. ADN-ul genomic a fost extras în LNR și pregătit pentru expediere și secvențiere (NGS) către Universitatea Yale (SUA).

Rezultate.

Astfel, în perioada 2010-2019 au fost colectate 4174 tulpini *M.tuberculosis*, dintre care 2191 tulpini au fost sensibile și 1985 au demonstrat rezistență la preparatele antituberculoase. Studiul retrospectiv (2010-2017) a avut ca scop evaluarea fenomenului de tuberculoză cu rezistență multiplă pe teritoriul republicii. Pentru aceasta în acest studiu au fost selectate cu preponderență tulpini de la pacienții cu astfel de formă a tuberculozei, dintre care doar 38.2% (n=717) au fost tulpini sensibile și 61,8% (n=1160) au demonstrat rezistență la minimum Isoniazidă și Rifampicină. Pentru studiul prospectiv (2018-2019) au fost colectate și incluse în studiu toate culturile pozitive prin cultură de la pacienții cu tuberculoză din toate teritoriile republicii. Din aceste considerente datele obținute în studiul prospectiv demonstrează situația epidemiologică reală pentru această perioadă. În total în studiul prospectiv au fost incluși 2299 pacienți dintre care 64,1% (n=1474) au fost pacienți cu tulpini sensibile și 359% (n=825) au fost pacienți cu rezistență minimum la Rifampicină.

În digrama 1 sunt te datele obținute în ambele studii.

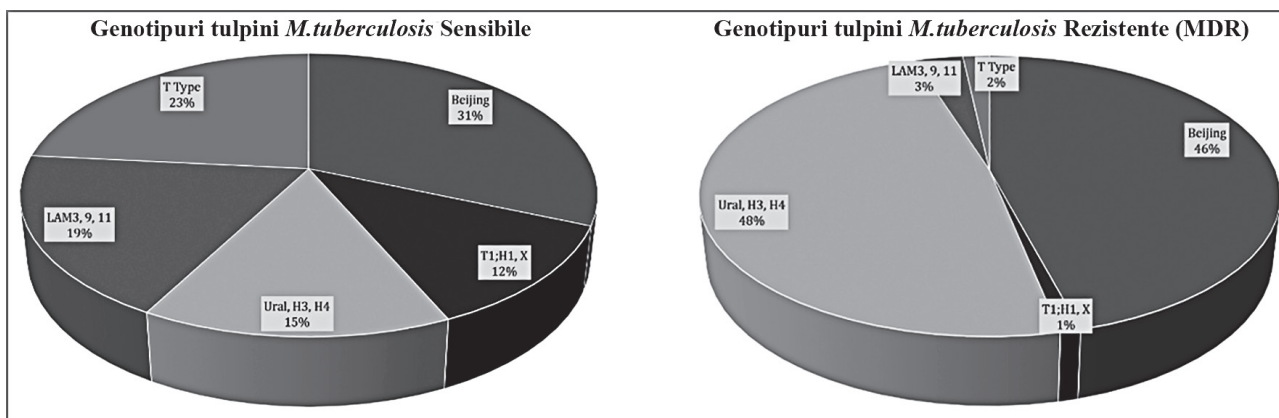


Diagrama 1. Distribuția genotipurilor cu tulpini sensibile și tulpini rezistente a *M. tuberculosis*

Conform datelor din diagramă, cel mai frecvent printre tulpinile studiate au fost depistate tulpinile *M. tuberculosis* genotipul Beijing (Lineage 2.2.1) – 38.2% (n=1596) și Ural (Lineage 4.2.1) – 30,6 (n=1278). Totodată se constată o distribuție diferită a tulpinilor studiate în dependență de sensibilitatea față de medicamentele antituberculoase. Printre tulpinile sensibile la medicamentele tulpinile genotipul Beijing și Ural sau constatat corespunzător în – 31,4 (n=687) și 14,6% (n=320). Dintre alte genotipuri printre tulpinile sensibile sau depistat genotipurile X (Lineage 4.1.1)– 0,6% (n=13), T1, H1 (Lineage 4.1.2)– 11,4% (n=249), LAM (Lineage 4.2.2, (Lineage 4.2.2, 4.3.1, 4.3.3, 4.3.4) 514)– 18,6 (n=408) și genotipul T (Lineage 4.7, 4.9, 4.9) – 23,5% (n=514).

Printre tulpinile rezistente la medicamentele tulpinile genotipul Beijing și Ural sau constatat corespunzător în – 45,8% (n=909) și 48,3% (n=958). Datele obținute demonstrează datele obținute în studiile precedente de autori locali, precum și în alte studii din alte regiuni, în special din Europa de Est.

După cum am menționat mai sus, pentru analiza genomică și reconstrucția filogeniei au fost analizate doar datele din studiul prospectiv. Au fost incluse pentru analiza genomică și reconstrucția filogeniei 2220 de participanți, care aveau minimum o tulpină pozitivă cu secvențierea genomului bacterian. Dintre acestea la 17,4% (n=386) au fost identificate tulpini mixte și eliminate, rezultând un set de date final de 1834 participanți cu o singură tulpină *M. tuberculosis* izolată.

55,3% (n=1014) izolate au aparținut genotipului Ural (Lineage 4.2.1) și 43,8% (n=804) au aparținut genotipului Beijing (Lineage 2/sublineage 2.2.1). Cartografierea a dezvăluit modele geografice distincte pentru cele trei clade majore MDR-TB: clada 1 cuprinzând 243 izolate Ural/lineajul 4.2.1 care au fost distribuite pe scară largă, în timp ce clada 2 și clada 3 care conțineau 102 și 121 tulpini Beijing/linie 2.2.1 au fost concentrate în Transnistria. Majoritatea

pacienților cu tulpini din aceste trei clade pacienți cu re-tratamente cu MDR-TB.

Cele trei clade mari au fost compuse aproape în întregime din izolate MDR (96%, 449 din 466). Mutațiile care conferă rezistență pentru Isoniazidă și Rifampicină au fost similare și au fost găsite în codonul katG 315 și în regiunea de determinare a rezistenței la Rifampicină de 81 bp (RRDR). Cu toate acestea, fiecare dintre aceste trei clade a avut mutații distinctive suplimentare de rezistență la medicamente: izolatele din clada 1 din tulpina Ural/liniea 4 a găzduit o mutație a promotorului eis (-12 C>T) care conferă rezistență la kanamicină, o cladă din tulpina/liniea 2 din Beijing a avut o ethA (110-110 del), asociat cu rezistența la etionamidă, în timp ce celălalt avea mutații thyX (-16 C>T) și thyA (Arg222Gly), asociate cu rezistența la acidul p-aminosalicilic. Am identificat, de asemenea, grupuri de izolate care adăpostesc mutații suplimentare rezistente la medicamente asociate cu medicamentele în schemele de tratament MDR recent recomandate, inclusiv lineozid (n=14), bedaquilina (n=1) și delamanid (n=9).

Dintre cele 1834 izolate de *M. tuberculosis*, 1551 (85,6%) au format grupuri cu dimensiuni variind de la 2 la 105, iar 1000 (54,5%) au aparținut la 35 de grupuri mari cu cel puțin 10 participanți la pragul de grupare de 0,001 substituții/sit. Distanța mediană SNP în toate clusterurile de transmisie a fost de 14 SNP (IQR 10-18 SNP), cu distanța mediană SNP în cadrul clusterului variind între 0-26 SNP.

Din 672 de izolate MDR-TB incluse în analiza finală, 619 (92,1%) făceau parte dintr-un cluster și 454 (67,6%) aparțineau unuia dintre cele 35 de grupuri mari de transmisie. Individizii cu MDR-TB au avut mai multe șanse să se afle în grupuri mari decât individizii cu boală pan-sensibilă. Opt dintre cele 14 izolate MDR plus rezistente la linezolid au fost membri ai grupurilor mari. Dintre cele nouă izolate MDR cu rezistență la delamanid, șapte au avut aceeași mutație de rezistență asociată delamanidelor, formând un singur sub-cluster

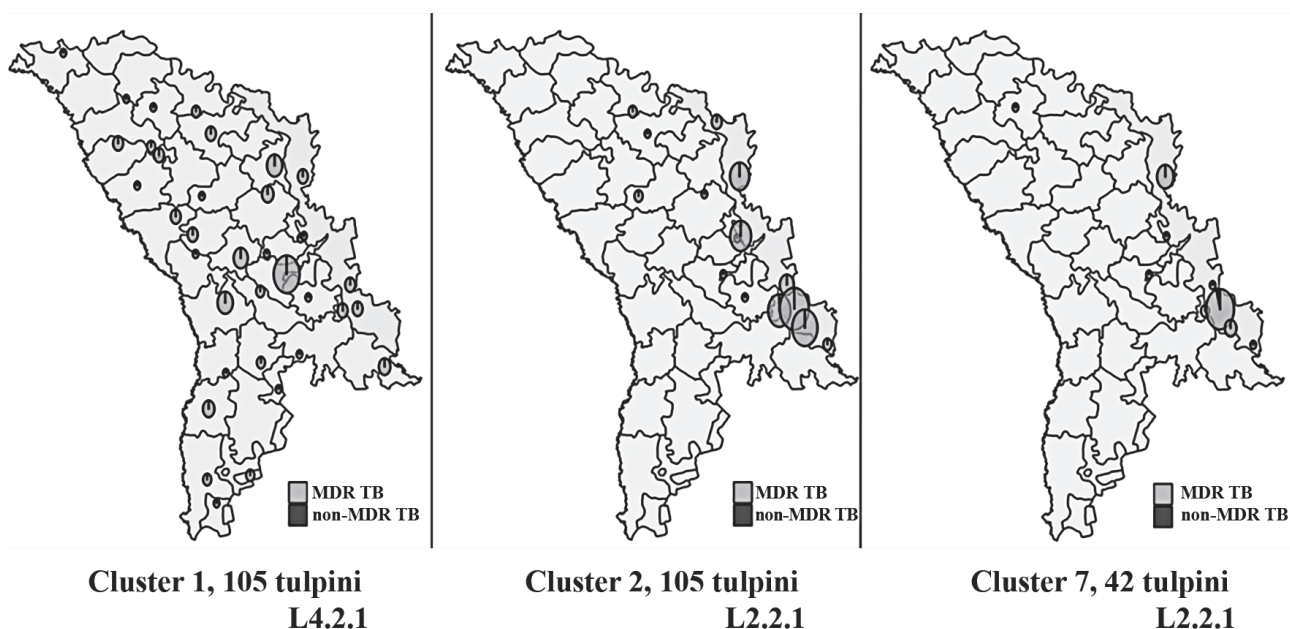


Figura 1. Distribuția spațială a 3, cele mai mari cluster (Cluster 1, 2 și 7) în cladele Ural/Lineage 4.2.1 și Beijing/Lineage 2.2.1.

cu o distanță medie SNP pe perechi de < 5 SNP, ceea ce sugerează transmiterea recentă a acestei tulpini de *M. tuberculosis* foarte rezistentă în Moldova.

O examinare mai aprofundată a celor 35 de grupuri mari de transmisie presupusă a relevat diferențe demografice și epidemiologice distincte între grupuri. Cel mai mare grup de transmisie (Cluster 1) a inclus 105 de participanți cu colorația sub-lineajul 4.2.1/Ural Clade 1 care se afla în întreaga țară. În schimb, următorul cel mai mare grup (Cluster 2) a inclus 102 participanți cu sub-lineajul 2.2.1/Beijing Clade 2 care au fost depistați predominant în Transnistria (Fig.1). Șaisprezece dintre cele 35 de grupuri mari au fost compuse aproape în întregime din MDR-TB (Fig. 1). În special, au existat diferențe demografice specifice grupurilor observate între grupurile de transmisie, cele mai mari două grupuri cuprinzând o proporție mare de deținuți anteriori și raportând condiții de viață nesatisfăcătoare.

Discuții.

Am descris circulația recentă a trei cluster distincte de *M. tuberculosis* (unul genotipul Ural și două din genotipul Beijing) responsabile pentru marea majoritate a MDR-TB în Moldova. În timp ce aceste clade împărtășesc mutații similare care conferă INH și RIF, există mutații suplimentare specifice cladelor care conferă rezistență la antibiotice TB importante de linia a doua, critice pentru succesul tratamentului MDR.

Rețelele largi de transmisie bazate pe asemănarea genomică au arătat că >85% din toate cazurile de TB cu cultură pozitivă din Moldova ar putea fi mapate în grupuri presupuse de transmisie și că majoritatea

(>54%) dintre aceste cazuri au fost găsite în 35 de grupuri mari de transmisie. Rolul transmiterii recente a fost și mai pronunțat pentru cazurile de TB-MDR, printre care > 92% au fost găsite în grupuri de transmisie presupuse (și > 67% găsite în cadrul celor 35 de grupuri mari de transmisie). Persoanele cu MDR-TB au avut șanse de peste trei ori mai mari de a se afla într-un grup mare de transmitere în comparație cu persoanele cu TB pan-susceptibilă. Alte covariabile notabile asociate cu șansele crescute de a fi într-un grup mare de transmitere au inclus reședința urbană, încarcerarea anterioară și antecedentele de tratament anterior pentru TBC. Am descoperit că perechile cu momente mai apropiate de diagnostic și care trăiesc în aceeași localitate au avut cea mai mare similitudine genomică și că, pentru perechile din localități diferite, proximitatea spațială mai apropiată a fost asociată cu o asemănare genomică mai mare.

Analizele anterioare ale datelor de supraveghere au evidențiat o eterogenitate spațială uimitoare a TB-MDR în Moldova, cu incidența TB-MDR diferită de peste un ordin de mărime pentru diferite localități²⁵, dar mecanismele care conduc această variație nu au fost descrise. Analiza noastră dezvăluie că această eterogenitate este rezultatul suprapunerii multiple a epidemiilor de TB-MDR transmise, dintre care unele se datorează clusterelor care s-au extins în întreaga țară, în timp ce altele sunt până acum limitate la anumite regiuni. Cel mai remarcabil, cele mai mari două grupuri de transmisie ale liniei Beijing se găsesc aproape exclusiv în Transnistria, unde, în unele localități, ratele de prevalență a MDR-TB este foarte mare.

Concluzii.

Sunt necesare implicații clinice și de sănătate publică urgente ale acestor constatări. În timp ce criza MDR-TB transmisă a fost deja evidentă, aceste date arată că există mai multe clase de tuberculoză foarte rezistente la medicamente care co-circulează, care diferă în ceea ce privește profilurile de rezistență la medicamente, distribuția geografică și traiectoria epidemiei.

Aceste rezultate sugerează urgența stopării transmiterii TB-MDR care este prezentă în toată Moldova, dar păstrează focare geografice notabile în Chișinău și în Transnistria. În timp ce rolul supravegherii genomice pentru informarea Programelor Naționale și implementarea intervențiilor în controlul tuberculozei în regiunile cu povară înaltă a acestei infecții rămâne incomplet explorat. Acest studiu oferă un exemplu important al modului în care astfel de informații pot fi utilizate pentru a înțelege epidemiologia complexă a MDR-TB.

Bibliografie.

1. Global tuberculosis report. Geneva: World Health Organization, 2022.
2. Vesga JF, Alexandru S, Vilc V, Crudu V, Bivol S, Celian C, Arinaminpathy N. *Lancet Glob Health*. 2019 May; 7(5):e585-e595. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30037-3. PubMed PMID: 30904521
3. 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*. *Eur Respir J*. 2014 April; 43(4):1132–1141. doi:10.1183/09031936.00203613.
4. Günther G, Alexandru S, , Crudu V, Lange C. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Aug 1;198(3):379-386. doi: 10.1164/rccm.201710-2141OC. PubMed PMID: 29509468.
5. Matthias Merker, Valeriu Crudu, Ulrich Nübel, Philip Supp, Stefan Niemann, Thierry Wirth. *Transcontinental spread and evolution of Mycobacterium tuberculosis W148 European/Russian clade towards extensively drug resistant tuberculosis*. *Nature Genetics*, 2021,11
6. The New Profile of Drug-Resistant Tuberculosis in Russia: A Global and Local Perspective: Summary of a Joint Workshop. Washington (DC)2011.
7. Kendall EA, Fofana MO, Dowdy DW. *Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: a transmission modelling analysis*. *Lancet Respir Med* 2015;3:963-72.
8. Crudu V, Merker M, Lange C, et al. *Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2015;19:1520-3.
9. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, et al. *Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens*. *Science* 2004;303:327-32.
10. Lemey P, Rambaut A, Welch JJ, Suchard MA. *Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time*. *Mol Biol Evol* 2010;27:1877-85.
11. Pybus OG, Suchard MA, Lemey P, et al. *Unifying the spatial epidemiology and molecular evolution of emerging epidemics*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:15066-71.
12. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, et al. *Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population*. *Nat Genet* 2014;46:279-86.
13. Wollenberg K, Harris M, Gabrielian A, Crudu V, et al. *A retrospective genomic analysis of drug-resistant strains of M. tuberculosis in a high-burden setting, with an emphasis on comparative diagnostics and reactivation and reinfection status*. *BMC Infect Dis* 2020;20:17.
14. Merker M, Barbier M, Cox H, et al. *Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia*. *Elife* 2018;7.
15. Tyler S, Brown VE, Sofia Alexandru, Ecaterina Noroc, Nelly Ciobanu, Valeriu Crudu, Ted Cohen, Mathe-ma B. *Evolution and emergence of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Chisinau, Moldova*. medRxiv 2021; <https://doi.org/10.1101/2021.02.04.21251152>
16. Jenkins HE, Crudu V., Cohen T., et al. *Assessing spatial heterogeneity of multidrug-resistant tuberculosis in a high-burden country*. *Eur Respir J* 2013;42:1291-301.
17. Nelly Ciobanu, Alexandru Codreanu, Nadejda Țurcan și Valeriu Crudu. *Nivelul de rezistență fenotipică și paternul de mutații genice a M.tuberculosis*. *Buletinul AŞM*, 1(69)/2021, p.38