

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU” DIN REPUBLICA MOLDOVA**

Cu titlu de manuscris

CZU: 616.24-002.5-022.3:616-052:614.21(043.2)

NOROC Ecaterina

**EVALUAREA ȘI PRIORITIZAREA FACTORILOR DE RISC ÎN
TRANSMITEREA TUBERCULOZEI REZISTENTE LA
PACIENȚII SPITALIZAȚI**

313.02 MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău, 2024

Teza a fost elaborată în Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei, IMSP Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, Republica Moldova și în cadrul Centrului de Cercetări din Borstel, Germania.

Conducător:

CRUDU Valeriu doctor în științe medicale, conferențiar cercetător

Consultanți științifici:

LANGE Christoph doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar (Centrul de cercetări din Borstel, Germania)

NIEMANN Stefan doctor habilitat în științe, profesor universitar (Centrul de cercetări din Borstel, Germania)

Referenți oficiali:

BALAN Greta doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

IAVORSCHI Constantin doctor habilitat în științe medicale, profesor cercetător

Consiliul Științific Specializat a fost aprobat de către Consiliul de conducere al ANACEC prin decizia nr. 2 din 19 decembrie 2023, în următoarea componență:

HOLBAN Tiberiu președinte, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

LOZAN-TÎRȘU Carolina secretar, doctor în științe medicale, conferențiar universitar

GHINDA Serghei doctor habilitat în științe medicale, profesor cercetător

RUSU Doina doctor în științe medicale, conferențiar universitar

VOROJBIT Valentina doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la 06 martie 2024, ora 14.00, în ședința Consiliului Științific Specializat D 313.02-23-131 din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (bl. Ștefan cel Mare și Sfânt nr. 165, biroul 204, Chisinau, MD-2004).

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a ANACEC (www.anacec.md).

Rezumatul a fost expediat la 02 februarie 2024.

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat:

Lozan-Tîrșu Carolina doctor în științe medicale, conferențiar universitar

Conducător:

CRUDU Valeriu doctor în științe medicale, conferențiar cercetător

Consultanți științifici:

LANGE Christoph doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar (Centrul de cercetări din Borstel, Germania)

NIEMANN Stefan doctor habilitat în științe, profesor universitar (Centrul de cercetări din Borstel, Germania)

Autor

Noroc Ecaterina

© Noroc Ecaterina, 2024

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII.....	4
CONȚINUTUL TEZEI.....	7
1 EPIDEMIOLOGIA TUBERCULOZEI REZISTENTE ȘI POLITICILE DE SĂNĂTATE PUBLICĂ ELABORATE ÎN STOPAREA TRANSMITERII ACESTEI INFECȚII.....	7
2 MATERIALE ȘI METODE.....	7
3 DINAMICA LOCAȚIEI PACIENȚILOR ȘI EVALUAREA FACTORILOR DETERMINANȚI CARE AR PUTEA INDUCE INSUCESUL TRATAMENTULUI	9
3.1 Studierea migrării pacienților spitalizați în interiorul instituției	10
3.2 Analiza descriptivă a coortei pacienților spitalizați cu tuberculoză.....	12
4 ANALIZA FILOGENETICĂ ȘI IDENTIFICAREA CLUSTERELOR DE TRANSMITERE	16
4.1 Deducerea evenimentelor de transmitere de la pacient la pacient.....	17
4.2 Analiza epidemiologică moleculară	17
4.3 Secvențierea integrală a genomului micobacterian și analiza distanței genetice spațiale...	18
5 EVALUAREA CUNOȘTIINȚELOR EPIDEMIOLOGICE ÎN DOMENIUL CONTROLULUI INFECȚIEI TB PRIN CHESTIONAREA PERSONALULUI MEDICAL CE ACTIVEAZĂ ÎN INSTITUȚIA MEDICALĂ	22
CONCLUZII GENERALE	23
RECOMANDĂRI.....	24
BIBLIOGRAFIE.....	25
LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI	28
ADNOTARE.....	30
АННОТАЦИЯ	31
ANNOTATION	32

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei. Tuberculoza (TB) se numără printre principalele cauze de morbiditate și mortalitate la nivel mondial și este asociată cu o povară socială și de sănătate publică importantă [1]. Unul dintre scopurile de bază ale Obiectivelor de Dezvoltare Durabilă pentru perioada 2015-2030 este de a pune capăt epidemiei de TB la nivel mondial [2]. În conformitate cu acest obiectiv, Strategia OMS de eradicare a TB (END TB), aprobată de către Adunarea Mondială a Sănătății în 2014, țintește o reducere cu 90% a deceselor cauzate de TB și o scădere cu 80% a ratei de incidență a TB până în anul 2030 [3]. Republica Moldova este una dintre cele 18 țări ale regiunii europene a OMS în cadrul căreia controlul TB este prioritar și una dintre cele 30 de țări ale lumii cu cea mai mare povară a TB RR/MDR [4].

Potrivit datelor OMS, Republica Moldova a diagnosticat și a notificat în 2014 – 814 cazuri cu TB RR/MDR (sau 54,2% din numărul estimat) și 508 cazuri cu TB RR/MDR (sau 50,8% din numărul estimat) în anul 2021, date care concluzionează că rata de detecție privind cazurile cu TB RR/MDR rămâne încă neatinsă de țară, ținta OMS fiind de 85% [5]. Pe parcursul anilor 2014-2021, ponderea cazurilor cu TB RR/MDR a variat între 24,4% (2018) și 32,9% (2019) printre cazurile noi. Ratele de succes la tratamentul TB printre cazurile cu TB sensibilă și printre cazurile cu TB RR/MDR pe parcursul anilor 2014-2021 nu au atins țintele de 85% și 75%, respectiv, stabilite de către OMS [5]. Cauzele de bază ale insuccesului la tratament sunt atribuite în mare parte decesului, eșecului la tratamentul specific și pierduților din supravegherea medicală.

În Republica Moldova este asigurat accesul universal la diagnosticul și tratamentul TB de calitate pentru toate persoanele, cu o acoperire geografică completă. Au fost dezvoltate politici de suport pentru aderența la tratamentul TB. Republica Moldova este prima țară din Regiune care a asigurat disponibilitatea metodei rapide de diagnostic GeneXpert la nivelul întregii rețele de laboratoare care efectuează microscopia (57 de laboratoare). A fost modernizat diagnosticul de laborator prin implementarea mai multor metode rapide de diagnosticare (Bactec MGIT 960, Line Probe Assay, Pyrosequencing, etc.).

Înteruperea ciclului de transmitere a *Mtbc* este crucială pentru un control eficient al TB, ceea ce impune implementarea intervențiilor menite să reducă la minimum riscul de transmitere a TB prin diagnosticarea rapidă și timpurie, gestionarea adecvată a pacienților cu TB, implementarea practicilor de control al infecției TB [6,7,8]. Datele care reflectă situația epidemiologică prin TB în țară, precum și alte studii realizate la subiectul transmiterii intra-spitalicești a TB RR/MDR, inclusiv datele literaturii de profil sugerează faptul că transmiterea nosocomială în staționările de ftiziopneumologie devine o problemă stringentă în controlul TB. Cercetarea anterioară care a identificat transmiterea nosocomială a tulpinilor RR/MDR de *Mtbc* în 5,1%, a constatat acest fapt prin aplicarea metodelor care au determinat unități repetitive intercalate cu 24 de locusuri micobacteriene-număr variabil de repetări în tandem (MIRU-VNTR) și spoligotipare [9]. Rezultatele existente devin insuficiente, în contextul existenței metodelor și tehnologiilor noi, care permit determinarea transmiterii nosocomiale, ceea ce impune necesitatea efectuării unei cercetări de

studiere a fenomenului de transmitere nosocomială a TB RR/MDR în Republica Moldova într-un aspect aprofundat, prin aplicarea noilor metode și tehnologiilor contemporane de secvențiere a întregului genom micobacterian.

Scopul lucrării: evaluarea și prioritizarea factorilor de risc în transmiterea TB rezistente la pacienții spitalizați în Republica Moldova.

Obiectivele lucrării:

1. Documentarea și evaluarea fenomenului de transmitere nosocomială a tuberculozei printre pacienții spitalizați pentru tratamentul specific în spitalul de profil;
2. Identificarea mutațiilor genice care conferă rezistență la medicamentele anti-tuberculoase în tulpinile de *Mtbc* multidrogrezistente și evaluarea factorilor determinanți, responsabili pentru insuccesul tratamentului;
3. Analiza filogenetică și identificarea principalelor clustere responsabile de transmiterea nosocomială, prin aplicarea metodelor de secvențiere integrală a genomului micobacterian și deducerea evenimentelor de transmitere directă bazată pe distanța genetică;
4. Evaluarea cunoștințelor în rândul personalului medical care activează în spitalul de profil în domeniul controlului infecției în tuberculoză.

Ipoteza cercetării:

1. Urmărirea prospectivă a locației pacientului internat în staționarul de ftiziopneumologie privind elucidarea evenimentelor de transmitere nosocomială a TB RR/MDR;
2. Aplicarea metodelor contemporane bazate pe tehnologia de secvențiere a întregului genom micobacterian ce permite depistarea transmiterii nosocomiale a TB RR/MDR;
3. Implementarea măsurilor de control al infecției în cadrul staționarilor de ftiziopneumologie pentru reducerea substanțială a fenomenului de transmitere nosocomială a TB, în special, a TB RR/MDR.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese.

Metodologia prezentei lucrări a fost formulată și definitivată urmând metodele expuse în lucrările științifice din domeniu, bazată pe materiale metodico-didactice tematice din domeniul cercetat, documente de politici și materiale informative de nivel național și internațional.

Problema științifică soluționată în domeniul respectiv. Cercetarea prospectivă detaliată a tuturor pacienților spitalizați în cadrul spitalului de profil a demonstrat o rată de transmitere nosocomială a complexului *Mtbc* RR/MDR redusă, în perioada de cercetare.

1. Cohorta cu TB RR/MDR existentă este concentrată în 2 linii de descendențe de TB (Beijing și Ural).
2. Analizele filogeografice au evidențiat modele distincte geografic de transmitere pentru tulpinile Beijing MDR, dar mai restrânse pentru tulpinile Ural MDR.
3. Fiecare grup presupus de transmitere a TB RR/MDR a avut o rezistență distinctă la medicamente antituberculoase de linia a doua.

Importanța teoretică a cercetării. Transmiterea TB RR/MDR reprezintă o provocare majoră pentru controlul TB în mai multe țări, inclusiv pentru Republica Moldova, dar o înțelegere detaliată a dinamicii locale privind transmiterea tuberculozei și a TB RR/MDR este evazivă. Progresele și posibilitățile tot mai largi în domeniul secvențierii întregului genom micobacterian și dezvoltarea de noi abordări statistice

pentru combinarea datelor în timp și spațiu, epidemiologice și genomice pentru aprecierea fenomenului de transmitere nosocomială cu o rezoluție înaltă, oferă noi oportunități în acest domeniu.

Valoarea aplicativă a lucrării. Este o cercetare în premieră care a secvențiat toate izolatele de *Mtbc* dintr-un spital în care toți pacienți au fost monitorizați zilnic, urmărind locația lor în cadrul secțiilor și a saloanelor, cât și transferul lor în alte secții și oferă informații unice asupra complexității transmiterii TB RR/MDR în Republica Moldova.

Etapale cercetării au inclus: studierea literaturii de profil, determinarea locației desfășurării studiului (IFP), determinarea eșantioanelor de cercetare (pacienți spitalizați și personal medical), etapizarea proceselor referitoare la dinamica locației pacientului, monitorizarea clinică și microbiologică a pacientului timp de 2 ani, gruparea pacienților în funcție de rezultatele microbiologice, aplicarea metodelor microbiologice specifice etapelor de studiu (selectarea tulpinilor, re-creșterea tulpinilor, izolarea ADN-ului, secvențierea), chestionarea personalului medical. În studiu au fost incluși 2740 de pacienți spitalizați în cadrul IFP în perioada 01 iulie 2014-30 iunie 2015; 56 personal medical care activează în cadrul secțiilor clinice ale IFP. Metode aplicate: istorică, colectare de date, statistică, epidemiologică, microbiologică și analitică. Prelucrarea statistică a materialului acumulat a fost efectuată utilizând programul de analiză statistică SPSS.

Rezultatele cercetării au fost implementate în cadrul IMSP Institutul de Ftiziopneumologie “Chiril Draganiuc”, Laboratorul Național de Referință în microbiologia tuberculozei, începând cu anul 2015, documentat prin Actul de implementare a inovației nr. 41 din 05 mai 2023.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării științifice au fost prezentate și apreciate la multiple conferințe și congrese naționale și internaționale în domeniul tuberculozei: Conferință științifică națională cu participare internațională „Noi abordări în controlul bolilor respiratorii. Integrarea serviciilor”, 20 – 21 Decembrie 2023, Chișinău, Republica Moldova; Conferința științifico-practică consacrată Zilei Mondiale de combatere a tuberculozei cu genericul „DA! Putem învinge tuberculoza” 24 martie 2023; Conferința Mondială a Uniunii UNION privind sănătatea pulmonară, Eveniment virtual, 2022; Societatea Europeană de Micobacteriologie, Valencia, Spania, 2019; Cea de-a 48-a Conferință Mondială a Uniunii privind sănătatea pulmonară, Guadalajara, Mexico, 2017; A III-a Conferință Națională a secțiunii de tuberculoză, Timișoara, România 2016; Cea de-a 47-a Conferință Mondială a Uniunii privind sănătatea pulmonară, Liverpool, Marea Britanie, 2016; Congresul Societății Europene de Respirologie, Munich, Germania, 2014.

Lucrare a fost prezentată, discutată și aprobată la ședința Disciplinei de microbiologie și imunologie, Departamentul Medicină Preventivă, USMF „Nicolae Testemițanu” din 16.06.2023, Proces Verbal nr. 12 și la ședința Seminarului Științific de profil 313. Imunologie, microbiologie, virusologie, specialitățile 321.09. Boli infecțioase, tropicale și parazitologie medicală, 313.02. Microbiologie, virusologie medicală din 04.07.2023, Proces Verbal nr. 5.

Publicații la tema tezei. Au fost publicate 15 lucrări științifice, inclusiv 6 articole în revistele din bazele de date Web of Science și SCOPUS, 2 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, categoria B, 7 teze în lucrările conferințelor

științifice internaționale (peste hotare). Rezultatele studiului au fost raportate în cadrul a 3 participări cu comunicare națională și internațională. Ca rezultate ale studiului au fost conferite un certificate de inovație și un act de implementare.

Volumul și structura tezei. Teza este scrisă în limba română cu titlu de manuscris. Este expusă pe 122 pagini text de bază, tehnoredactate la calculator și conține: introducere, adnotarea în limbile română, rusă și engleză, lista tabelor, lista figurilor, lista abrevierilor, 5 capitole cu rezultate proprii și discutarea lor, concluzii și recomandări practice, bibliografie din 241 de titluri de referință, 17 anexe, declarația pe propria răspundere și CV-ul autorului. Materialul iconografic conține 15 tabele și 37 figuri.

Cuvinte-cheie: tuberculoză, multi-drogrezistență, transmitere nosocomială, Ural, Beijing.

Aprobarea etică

Studiul "Evaluarea și prioritizarea factorilor de risc în transmiterea tuberculozei rezistente la pacienți spitalizați" a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” cu numărul #15_49/2014, Chișinău, Republica Moldova.

CONȚINUTUL TEZEI

1 EPIDEMIOLOGIA TUBERCULOZEI REZISTENTE ȘI POLITICILE DE SĂNĂTATE PUBLICĂ ELABORATE ÎN STOPAREA TRANSMITERII ACESTEI INFECȚII

Sinteza literaturii de specialitate la problema studiată este prezentată în **capitolul 1** „*Epidemiologia tuberculozei rezistente și politicile de sănătate publică elaborate în stoparea transmiterii acestei infecții*” fiind evidențiate cunoștințele actuale din domeniul de cercetare. În descrierea capitolului sunt prezentate analizele critice ale 241 de referințe în domeniul cercetării anterioare și evidențiate lacunele și oportunitățile pentru cercetarea ulterioară.

TB este cauzată de *Mtbc*, care se răspândește atunci când persoanele infectate, răspândesc bacteria în aer, spre exemplu, prin intermediul tusei. Este estimat că o pătrime din populația planetei este infectată cu TB [10], însă majoritatea dintre aceștia nu ajung să dezvolte boala propriu-zisă [11,12]. Capacitatea organismului de a forma un răspuns imun adecvat la infecția cu TB este crucială în astfel de situații. Din numărul total de persoane care se îmbolnăvesc anual de TB, 90% sunt adulți, fiind înregistrate mai multe cazuri în rândul bărbaților decât al femeilor. TB afectează de regulă plămânii (TB pulmonară), însă poate afecta și alte organe. Din fericire, regimurile medicamentoase disponibile pot vindeca majoritatea pacienților [13], iar tratamentul TB este considerat a fi printre cele mai rentabile intervenții de sănătate [14]. Inițierea tratamentului specific adecvat, poate reduce eficient transmiterea și poate preveni răspândirea bolii.

Principalul factor care determină epidemia TB, inclusiv a TB rezistente în Europa de Est este transmiterea activă a bacteriilor *Mtbc* cu tulpini rezistente la medicamentele anti-microbiene utilizate în tratamentul TB [15].

2 MATERIALE ȘI METODE

În **Capitolul 2** „*Material și metode de cercetare*” sunt descrise metodele de cercetare aplicate prin prezentarea tipologiei metodelor și etapelor de realizare a

cercetării științifice. Prezenta lucrare este una comprehensivă, structurată pe etape și desfășurată după modelul liniar; bazată pe analiza documentelor relevante domeniului și cercetări operaționale, precum studiul observațional prospectiv în rândul pacienților și studiul descriptiv în rândul personalului medical.

Studiul privind cercetarea fenomenului transmiterii nosocomiale a infecției tuberculoase și evaluarea factorilor de risc asociați cu transmiterea TB MDR în condiții de staționar.

Cercetarea s-a bazat pe modelul studiului observațional prospectiv, întrucât acesta a fost unul inovativ și unic. În vederea realizării studiului, a fost aplicată următoarea strategie:

Etapa I. Au fost colectate listele pacienților cu diagnosticul stabilit de TB sau cu diagnostic sugestiv pentru TB, care au fost internați în perioada de la 01 iulie 2014 până pe 30 iunie 2015 în secțiile clinice din cadrul IFP. Criteriile de includere în studiu au fost: 1) vârsta mai mare de 18 ani; 2) locuitor al Republicii Moldova (malul drept); 3) cu diagnosticul stabilit de TB sau cu diagnostic sugestiv pentru TB; 4) internat în IFP (toate secțiile). Numărul total al eșantionului obținut a fost de 2490 persoane.

Etapa II. S-a urmărit prospectiv locația pacienților la nivelul salonului din spital, în baza patului pe care l-a ocupat fiecare pacient în fiecare zi pe perioada spitalizării. Paturile au fost numerotate consecutiv de la 1 până la 300.

Etapa III. Monitorizarea zilnică a fiecărui pacient pe durata internării și monitorizarea clinică și microbiologică în următorii 2 ani după externare. În funcție de rezultatele monitorizării, a urmat:

- a. Identificarea “pacienților focus” și a cohorței de pacienți cu TB RR/MDR;
- b. Selectarea pacienților care au avut o tulpină TB non-MDR în episodul de boală la momentul înrolării în studiu și pe parcursul monitorizării au dezvoltat o tulpină MDR;
- c. Identificarea pacienților din cohorta TB MDR, care au avut cel puțin o cultura pozitivă în perioada de studiu.

Etapa IV. Testarea specimenelor de spută: specimenele de spută au fost testate în cadrul LNR prin metoda microscopică, metodele bacteriologice pe mediul lichid și solid, ulterior cu efectuarea testelor de sensibilitate la preparatele antimicobacteriene. Culturile pozitive au fost reinoculate, după etapa de monitorizare și ulterior au fost supuse procesului de extragere a ADN-ului genomic micobacterian prin metoda bromurii de trimetil amoniu (CTAB).

Etapa V. Extragerea datelor din baza de date națională SIME TB pentru pacienții cu TB. Au fost extrase date socio-demografice (sex, vârstă, istoric de migrant), statut de rezidență (reședință rurală sau urbană și sat/localitate de origine); date epidemiologice (contact apropiat, data stabilirii diagnosticului de TB, tipul de caz, localizarea și forma de TB).

Studiul privind evaluarea cunoștințelor epidemiologice în domeniul controlului infecției, prin chestionarea personalului medical care activează în secțiile clinice ale IFP. A fost desfășurat un studiu descriptiv cu obiectivul de a reda competențele personalului medical (medici și asistente medicale) care activează în secțiile clinice ale spitalului. Pentru realizarea obiectivului, a fost elaborat un chestionar bazat pe literatura de profil [16] [17]. Chestionarul conține 29 de întrebări: 1) date generale (5 întrebări): vârsta, sex, profesia medicală, stagiul de muncă, secția

în care activează; 2) cunoștințe și percepții privind controlul infecției TB (11 și 13 întrebări, respectiv). Chestionarul aplicat este alcătuit din întrebări cu răspunsuri precodificate cu una sau mai multe variante de răspuns și răspunsuri scalare. Înainte de participare la chestionare, personalul medical a fost informat despre scopul și obiectivele studiului. Chestionarele aplicate au fost anonime cu respectarea principiilor de confidențialitate.

În studiu au fost incluși medici și asistente medicale care activează în secțiile clinice ale IFP. Au fost completate 56 de chestionare (7 medici și 49 de asistenți medicali), număr care a reprezentat 85% din personalul medical angajat în cadrul secțiilor clinice ale IFP (n=67; medici – 12, asistente medicale - 55).

Lucrarea expusă prezintă o cercetare comprehensivă, organizată după modelul linear și care înglobează o vastă sinteză bibliografică, studiu observațional prospectiv desfășurat în rândul pacienților, aplicarea metodelor microbiologice inovative și studiu descriptiv desfășurat în rândul personalului medical. În cadrul cercetării au fost aplicate metode complexe, inclusiv prin acumularea materialului clinic și observare statistică, dar și prin utilizarea metodelor de diagnostic de laborator de ultimă generație (testare fenotipică, izolarea ADN-genomic, secvențierea genomică). Eșantioanele incluse în studiu (pacienți și personal medical) sunt reprezentative din punct de vedere statistic. Interpretarea datelor s-a efectuat în baza semnificației statistice ($p < 0,05$) la intervalul de confidență de 95%.

3 DINAMICA LOCAȚIEI PACIENȚILOR ȘI EVALUAREA FACTORILOR DETERMINANȚI CARE AR PUTEA INDUCE INSUCCESUL TRATAMENTULUI

Descrierea populației de studiu. IFP este un spital terțiar, situat în municipiul Chișinău, capitala Republicii Moldova, care deservește populația adultă din toată țara, fiind specializat în diagnosticarea și tratamentul tuturor formelor de TB și a bolilor pulmonare non-TB. La momentul inițierii studiului, IFP deținea 5 secții principale în care se internau pacienții: Ftiziopneumologie #1 (FP-1) cu 55 de paturi amplasate în 10 saloane; Ftiziopneumologie #2 (FP-2) cu 80 de paturi în 14 saloane; Ftiziopneumologie #3 (FP-3) cu 50 de paturi în 11 saloane; secția multidrogrezistentă (MDR) cu 50 paturi în 16 saloane; secția TB Extrapulmonară și Chirurgie cu 60 paturi în 20 de saloane; o unitate de terapie intensivă (ATI) cu 5 paturi. Secțiile FP-1 și FP-2 reprezintă secții TB (non-MDR), secția FP-3 reprezintă secția non-TB, iar secția Chirurgie – secție mixtă pentru TB și MDR. Fluxul derulării studiului este prezentat în Figura 3.1 Diagrama de studiu.

Analiza descriptivă a pacienților spitalizați în cadrul spitalului. Cohorta inițială de studiu a fost constituită din 2490 de pacienți, internați în IFP. Cei mai mulți pacienți au fost internați în secția FP-3 (45,3%), urmată de secția FP-2 (17,9%), FP-1 (16,1%), Chirurgie (14,5%) și secția MDR (6,3%). Vârsta medie a pacienților internați în perioada de cercetare a fost de $50,9 \text{ DS} \pm 17,4$ ani și care a variat de la $37,2 (\pm 12,7)$ ani la $59,4 (\pm 17,5)$ ani printre pacienții din secția MDR și a celor din secția FP-3, respectiv.

Vârsta mai înaintată a fost observată printre pacienții internați în secția FP-3, iar cei mai tineri printre cei din secția MDR. S-a constatat că ponderea bărbaților a

predominat în secțiile de TB (FP-1, FP-2, MDR și Chirurgie) formând 62,5% (1014/1363) în comparație cu secția non-TB (54%; 609/1127); $p < 0,001$ [18]. Din numărul total de pacienți internați, mai mult de jumătate (55,4%) au fost cei cu TB, iar ceilalți (44,6%) au fost pacienți cu alte boli pulmonare. În secțiile de TB (FP-1, FP-2, MDR și Chirurgie) au fost internați 41 (1,6%; 41/2490) de pacienți cu alte boli pulmonare, iar în secția FP-3 (secție non-TB) au fost internați 57 (2,3%; 57/2490) de pacienți cu TB ($p > 0,05$) [18].

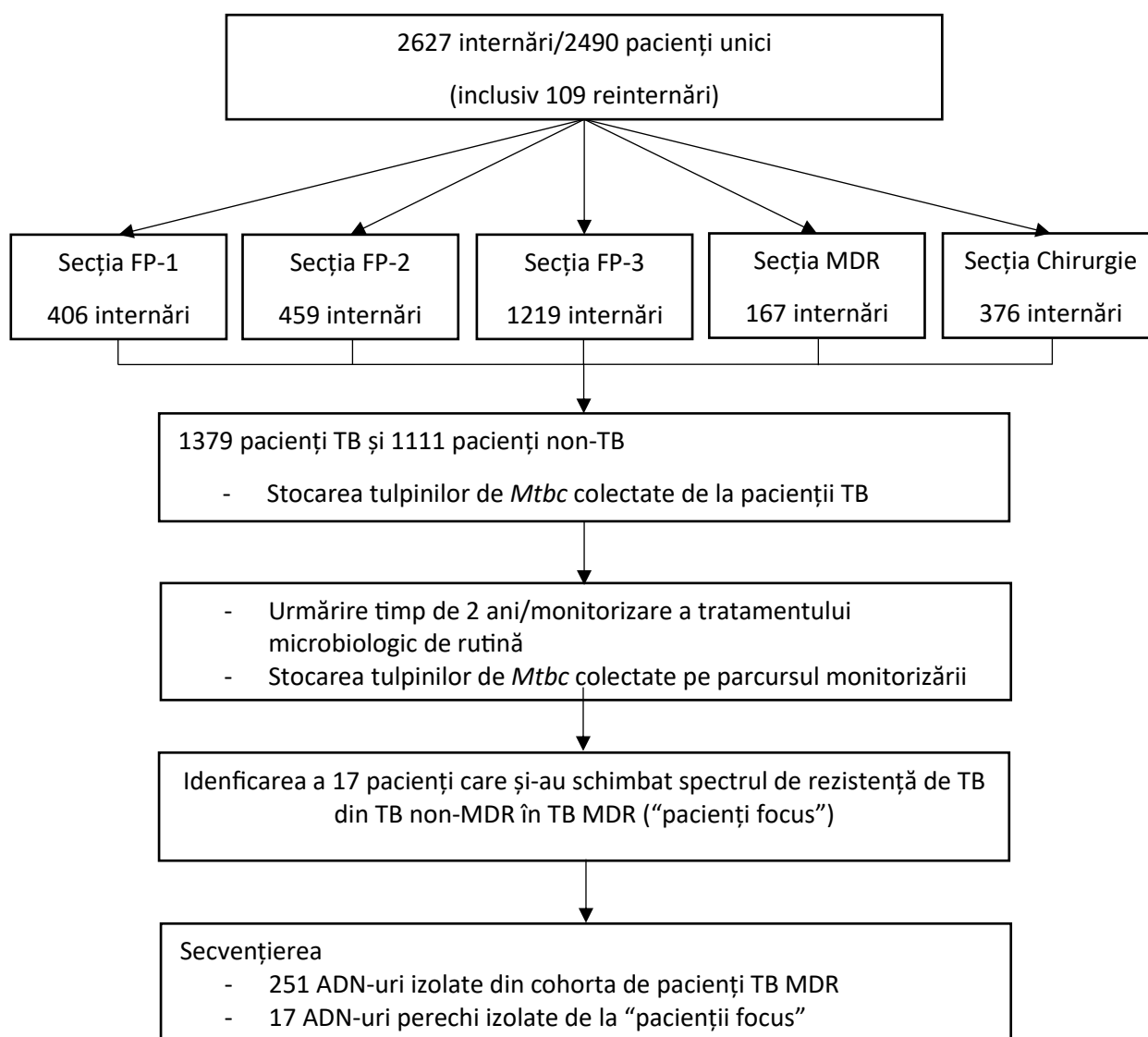


Fig. 3.1 Diagrama de studiu

3.1 Studiarea migrării pacienților spitalizați în interiorul instituției

Pentru cei 2490 de pacienți spitalizați au fost înregistrate 2627 de internări. Dintre pacienții internați, 2367 (95,1%) au fost internați o singură dată, iar 123 (4,9%) de pacienți cu internări multiple (109 pacienți au avut 2 internări, 13 au avut 3 internări și 1 pacient a avut 4 internări). Durata mediană de spitalizare în cadrul IFP, în perioada de studiu a fost de 22 [IQR 9-62] zile. Cea mai lungă durată de spitalizare (mediana 129 [IQR 93-168] zile) a fost în secția MDR, explicabilă prin regimuri lungi de tratament și practica medicală de a trata pacienții în faza intensivă, inclusiv până la conversia sputei prin cultură în condiții de staționar (Fig. 3.2) [19].

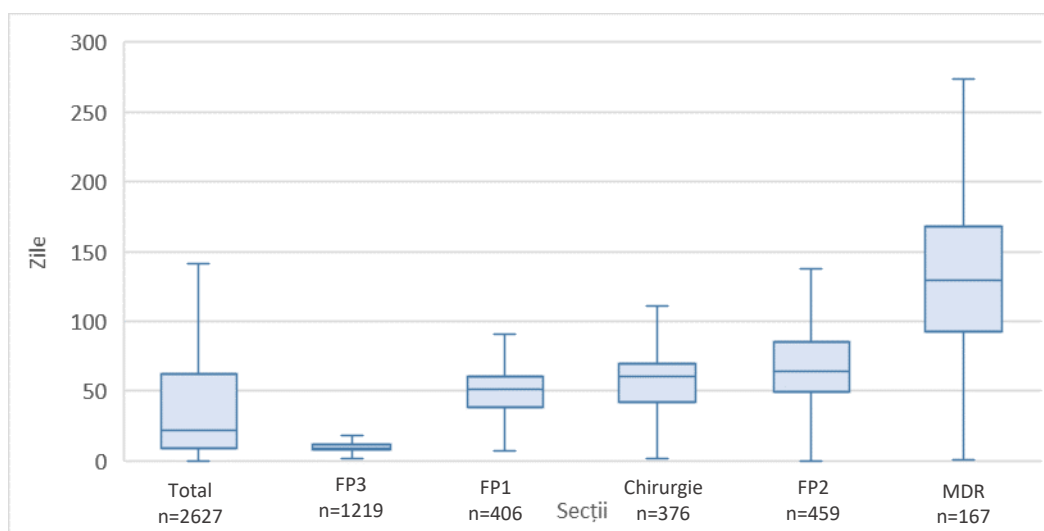


Fig. 3.2. Durata mediană de spitalizare a pacienților internați în IFP (număr zile), în perioada de studiu, repartizată după secții și numărul de internări

În același timp, cea mai scurtă durată mediană de spitalizare (mediana 9 zile [IQR 8-13,5]) a fost în secția FP-3, explicabilă prin tratamente de scurtă durată pentru bolile pulmonare, altele decât TB [18]. Mai mult de jumătate dintre internări (53,6%; 1408/2627) au fost în secțiile de TB; FP-1 a însumat 15,5% (n=406), FP-2 – 17,5% (n=459), secția MDR – 6,4% (n=167) și secția Chirurgie – 14,3% (n=376) din totalul de internări. În secția FP-3 au fost internați 46,4% (n=1219).

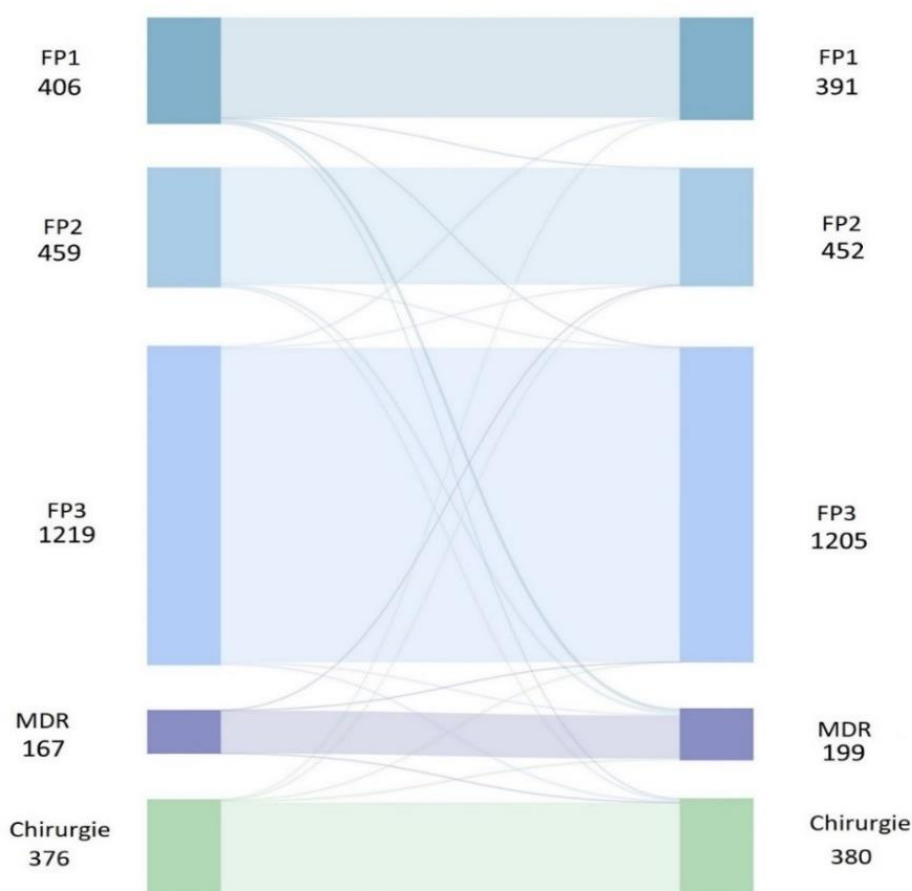


Fig. 3.3. Migrarea pacienților dintr-o secție în alta (75 de transferuri din 2627 de internări)

Cu privire la transferurile pacienților dintr-o secție în alta, 75 dintre pacienți au fost transferați într-o altă secție decât cea în care au fost internați inițial. Unul dintre pacienții transferați a fost transferat de două ori, iar altul a fost transferat de trei ori. Douăzeci și patru de pacienți internați inițial în secția FP-1 sau în secția FP-2 au fost ulterior transferați în secția MDR, iar alții 4 pacienți în secția FP-3. Nouă dintre pacienții internați inițial în secția FP-3 au fost transferați ulterior în secția FP-1 sau în secția FP-2 și alți 4 pacienți în secția MDR. Trei dintre pacienți internați inițial în secția MDR au fost ulterior transferați în secția FP-2 (1 pacient), în secția FP-1 (1 pacient) și în secția Chirurgie (1 pacient).

Cea mai înaltă rată de transfer a fost de la secția FP-1 (5,9%), urmată de secția de Chirurgie (3,5%), secția FP-2 (3,3%), secția MDR (1,8%) și secția FP-3 (1,6%). Durata mediană de spitalizare până la transferul în altă secție a fost de 7 [IQR 4-19] zile, cea mai scurtă fiind de 3 [IQR 1-75] zile la pacienții din secția MDR, iar cea mai lungă de 13 [IQR 5-32] zile la cei din secția FP-2 și 12 [IQR 4-48] zile la cei din secția Chirurgie. Durata mediană de spitalizare a fost de 6 [IQR 2-7,5] zile până la transferul din secția FP-1 și de 9 [IQR 4-13,5] zile până la transferul din secția FP-3.

În cadrul cercetării s-a analizat profilul de rezistență a *Mtbc* al pacienților care au fost transferați (n=75) în alte secții. Trebuie de menționat faptul că 41 dintre pacienți cu TB RR/MDR au fost internați inițial într-una dintre secțiile non-MDR. Dintre aceștia, 33 de pacienți au fost transferați ulterior în secția MDR, iar 8, în una dintre secțiile non-MDR: FP-2 (n=10), FP-3 (n=3) și secția Chirurgie (n=7). De menționat că acești 8 pacienți transferați în una dintre secțiile non-MDR, inițial au fost internați în secția FP-1 (n= 3), în secția FP-3 (n= 2) și în secția Chirurgie (n= 3). Pacienții cu TB RR/MDR au avut o durată mediană de spitalizare de 7 [IQR 4-18] zile în secțiile non-MDR, cu o durată cumulativă de 631 zile [18]. Numărul median și cel cumulativ de persoane contacte al pacienților cu TB RR/MDR din secțiile non-MDR a fost de 3 [IQR 2-5] și, respectiv, 144 de contacti.

3.2 Analiza descriptivă a cohortei pacienților spitalizați cu tuberculoză

Cohorta pacienților internați în IFP (în perioada 01.07.2014 – 30.06.2015) și diagnosticați cu TB a format 1379 de pacienți. Vârsta medie a fost de 43,8 ani ($DS \pm 13,8$) ani, mediana vârstei a constituit 44 ani, cel mai tânăr participant a avut 18 ani, iar cel mai în vârstă – 86 de ani. Bărbați (74,2%; n=1023) și cei din mediul rural (76,2%; n=1051) au format majoritatea. O cincime (19,8%; n=273) dintre participanții la studiu s-au aflat peste hotarele țării cel puțin 3 luni, în ultimele 12 luni anterior stabilirii diagnosticului de TB [18].

Întru reprezentativitatea cohortei de pacienți cu TB incluși în studiu, am recurs la comparabilitatea caracteristicilor demografice cu cohorta națională, formată din pacienții cu TB notificați în perioada anului 2014, regiunea malului drept al râului Nistru. Datele prezentate în tabelul de mai jos, confirmă că pacienții cu TB înrolați în studiu prezintă o similaritate statistică în conformitate cu parametrii de bază: precum sexul, grupul de vârstă, statutul HIV și statutul de migrant (Tabelul 3.1). În baza rezultatelor de laborator, prin metoda culturală (BACTEC MGIT 960 și/sau LJ) au fost confirmate 68,0% (n=938) dintre cazurile TB. Suplimentar, în rândul pacienților la care

nu a putut fi identificată *Mtbc* prin metode culturale (n=441), la 78 dintre aceștia a fost identificat ADN- ul *Mtbc* prin metoda Xpert MTB/RIF (sau 17,7%; 78/441).

Tabelul 3.1. Compararea cohortelor în baza parametrilor demografici și clinici

Caracteristici	Cohorta de studiu n=1379 n (%)	Cohorta națională n= 3846 n (%)	Valoarea p
Sex			
Bărbați	1023 (74,2)	2798 (72,7)	p>0,05
Femei	356 (25,8)	1048 (27,3)	p>0,05
Mediu de reședință			
Urban	328 (23,8)	1413 (36,7)	p<0,01
Rural	1051 (76,2)	2433 (63,2)	p<0,01
Vârsta			
≤ 44 ani	715 (51,8)	2023 (52,6)	p>0,05
> 45 ani	664 (48,2)	1823 (47,4)	p>0,05
Migrant*			
Da	273 (19,8)	708 (18,4)	p>0,05
Nu	1106 (80,2)	3138 (81,6)	p>0,05
Statut HIV			
Pozitiv	78 (5,7)	220 (5,7)	p>0,05
Negativ/necunoscut	1301 (94,3)	3626 (94,3)	p>0,05

Sursa pentru cohorta națională: SIME TB, registrul național de evidență a cazurilor cu TB

Astfel, numărul total de pacienți cu diagnosticul TB, confirmat prin metode culturale și/sau metoda Xpert MTB/RIF, a fost de 1016 din 1379 (73,7%). În 26,3% (363/1379) cazuri toate testele microbiologice pentru identificarea *Mtbc* au fost negative, iar diagnosticul de TB a fost stabilit în baza rezultatelor clinice [18].

Tabelul 3.2. Cohorta pacienților cu tuberculoză, după tipul de caz și localizarea procesului de tuberculoză, conform repartizării în secțiile spitalicești

Caracteristici	Total n=1379 n (%)	FP-1 n=397 n (%)	FP-2 n=442 n (%)	FP-3 n=57 n (%)	MDR n=156 n (%)	Chirurgie n=327 n (%)
Tip caz de TB						
Caz nou	1034 (75,0)	380 (95,7)	259 (58,6)	52 (91,2)	82 (52,6)	261 (79,8)
Re-tratament	345 (25,0)	17 (4,5)	183 (41,4)	5 (8,8)	74 (47,4)	66 (20,2)
Inclusiv: Recidivă	233 (16,9)	16 (4,0)	135 (30,5)	5 (8,9)	30 (19,2)	47 (14,4)
Alte re-tratamente	112 (8,1)	1 (0,3)	48 (10,9)	0 (0,0)	44 (28,2)	19 (5,8)
- pierdut	50 (3,6)	1 (0,3)	23 (5,2)	0	15 (9,6)	11 (3,4)
- eșec	62 (4,5)	0	25 (5,7)	0	29 (18,6)	8 (2,5)
Localizare TB						
Pulmonară	1114 (80,8)	369 (92,9)	425 (96,2)	44 (77,2)	149 (95,5)	127 (38,8)
Extra-pulmonară	183 (13,3)	8 (2,0)	3 (0,7)	11 (19,6)	1 (0,6)	160 (49,0)
Pulmonară și extra-pulmonară	82 (5,9)	20 (5,5)	14 (3,2)	2 (3,6)	6 (3,9)	40 (12,2)

Din numărul total de pacienți diagnosticați cu TB prin cel puțin una dintre metodele culturale (BACTEC MGIT 960 sau LJ; n=938), au fost diagnosticați pacienți cu tulpini sensibile în 60,5% (n=567), cu TB mono/poli-rezistentă - în 6,8% cazuri

(n=64), cu TB RR/MDR - 32,7% cazuri (307). Din numărul total de pacienți spitalizați în secția MDR, majoritate (90,4%) dintre aceștia au fost cu TB-MDR confirmată prin cultură, în conformitate cu profilul secției.

Cohorta de studiu supusă secvențierii a fost formată din 268 de pacienți, care, la rândul său, a cuprins 251 pacienți cu TB-MDR confirmată prin cultură pentru care a fost posibilă secvențierea și alți 17 pacienți care și-au schimbat profilul rezistenței din TB non-MDR în TB-MDR pe parcursul studiului. Prezența mutațiilor genetice responsabile de rezistența la medicamentele utilizate pentru tratamentul tuberculozei este redată în Fig. 3.4. De menționat că nu au fost identificate mutații la nivel de gene responsabile de rezistența la Clofazimină (CFZ), Linezolid (LZD), Bedaquilină (BDQ) și Delamanid (DLM). Cele mai frecvente mutații responsabile de rezistența tulpinii *Mtbc* la INH au fost mutațiile în gena *fabG1 -15c>t* & *katG* cu codul S315T (54,5%; [ÎI95%:48,52-60,44]) și în gena *katG* cu codul S315T (38,8%; [ÎI95%:32,97-44,64]). De menționat, aici, despre faptul confirmării frecvenții înalte a mutațiilor în genele *fabG1 -15c*, *katG* în cohorta studiată cu datele publicate la nivel internațional, studiu ce cuprinde o revizuire sistematică a 5804 de izolate cu rezistență la INH din 31 țări [21].

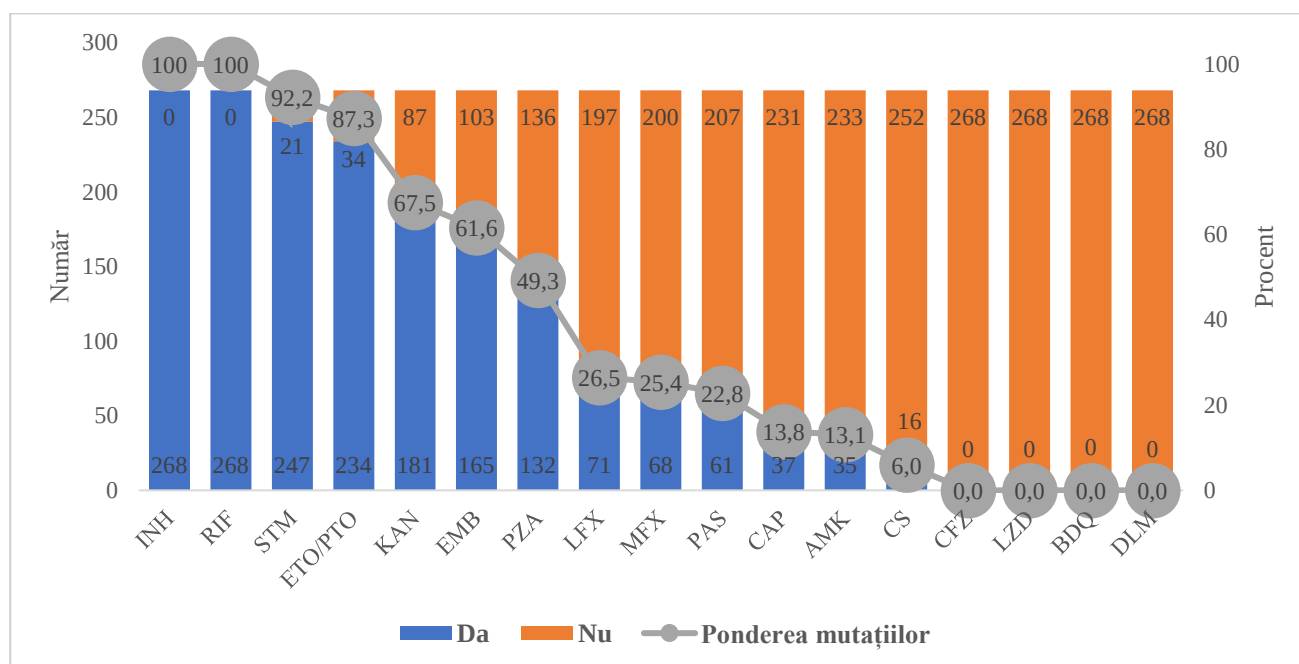


Fig. 3.4. Numărul și ponderea mutațiilor genetice care conferă rezistență la medicamentele anti-microbiene în tulpinile de TB MDR, supuse secvențierii

Mutația în gena *rpoB* cu codul S450L a provocat rezistență la RIF în 87,3% [ÎI95%:83,33-91,30] cazuri. Despre responsabilitatea mutației în gena *rpoB* cu codul S450L de a provoca rezistență înaltă la RIF se specifică în mai multe studii realizate la nivel internațional [21,22,23], fapt confirmat și în cohorta studiată. Prezența mutațiilor genetice responsabile de rezistența la medicamentele utilizate pentru tratamentul TB a fost determinată la 13 dintre 17 medicamente anti-microbiene supuse analizei și care variază de la 100% (INH și RIF, medicamente de linia I) și 6,0% (CS).

Tabelul 3.3. Gene și mutații care conferă rezistență la medicamente antimicrobiene în tulpinile de TB MDR, supuse secvențierii, n (%)

Denumire medicament / Gene responsabile de mutație	n	% [ÎI95%]
Numărul total de tulpini	268	
Prezența mutațiilor la Isoniazidă (INH)	268	100 [100 – 100]
Mutația - <i>fabG1 -15c>t</i> ; <i>katG S315T</i>	146	54,5 [48,52-60,44]
Mutația - <i>katG S315T</i>	104	38,8 [32,97-44,64]
Alte mutații (5 gene)	18	6,7 [3,71-9,69]
Prezența mutațiilor la Rifampicină (RIF)	268	100 [100 – 100]
Mutația - <i>rpoB S450L</i>	234	87,3 [83,33-91,30]
Alte mutații (11 gene)	34	12,7 [8,70-16,67]
Prezența mutațiilor la Streptomycină (STM)	247	92,2 [88,95-95,38]
Mutația - <i>rpsL K88R</i>	146	54,5 [48,14-60,07]
Mutația - <i>rpsL K43R</i>	91	34,0 [28,29-39,62]
Alte mutații (5 gene)	10	3,7 [1,73-6,47]
Lipsa mutațiilor	21	7,8 [4,62-11,05]
Prezența mutațiilor la Etambutol (EMB)	165	61,6 [55,74-67,39]
Mutația - <i>embB M306V</i>	57	21,3 [15,69-25,36]
Alte mutații (20 gene)	108	40,3 [35,21-46,99]
Lipsa mutațiilor	103	38,4 [32,61-44,26]
Prezența mutațiilor la Pirazinamidă (PZA)	132	49,3 [43,27-55,24]
Alte mutații (83 gene)	132	49,3 [43,31-55,29]
Lipsa mutațiilor	136	50,7 [44,76-56,73]
Prezența mutațiilor la Moxifloxacină (MFX)	68	25,4 [20,16-30,58]
Alte mutații (17 gene)	68	25,4 [20,16-30,58]
Lipsa mutațiilor	200	74,6 [69,42-79,84]
Prezența mutațiilor la Levofloxacină (LFX)	71	26,5 [21,21-31,78]
Alte mutații (21 gene)	71	26,5 [21,21-31,78]
Lipsa mutațiilor	197	73,5 [68,22-78,79]
Prezența mutațiilor la Kanamicină (KAN)	181	67,5 [61,93-73,14]
Mutația - <i>eis -12c>t</i>	129	48,1 [42,15-54,12]
Alte mutații (10 gene)	52	19,4 [14,67-24,13]
Lipsa mutațiilor	87	32,5 [26,86-38,07]
Prezența mutațiilor la Amikacină (AMK)	35	13,1 [9,03-17,09]
Alte mutații (4 gene)	35	13,1 [9,03-17,09]
Lipsa mutațiilor	233	86,9 [82,91-90,97]
Prezența mutațiilor la Capreomicină (CAP)	37	13,8 [9,68-17,94]
Alte mutații (7 gene)	37	13,8 [9,68-17,94]
Lipsa mutațiilor	231	86,2 [82,06-90,32]
Prezența mutațiilor la Etionamidă/Protionamidă (ETO/PTO)	234	87,3 [83,33-91,30]
Mutația - <i>fabG1 -15c>t</i> ; <i>ethA H281P</i>	130	48,5 [42,52-54,49]
Alte mutații (20 gene)	104	38,8 [32,97-44,64]
Lipsa mutațiilor	34	12,7 [8,70-16,67]
Prezența mutațiilor la Cicloserină (CS)	16	6,0 [3,13-8,81]
Alte mutații (16 gene)	16	6,0 [3,13-8,81]
Lipsa mutațiilor	252	94,0 [91,19-96,87]
Prezența mutațiilor la Acid para -aminosalicilic (PAS)	61	22,8 [17,74-27,78]
Mutația - <i>thyA R222G</i>	37	13,8 [9,68-17,94]
Alte mutații (5 gene)	24	9,0 [5,54-12,37]
Lipsa mutațiilor	207	77,2 [72,22-82,26]

Rezultatele tratamentului anti-tuberculos în cohorta TB-MDR a căror tulpini de *Mtbc* au fost supuse secvențierii, au înregistrat un succes la tratament în 48,1% cazuri. Analiza bivariată a determinat că tulpinile de *Mtbc* care au prezentat mutații în genele responsabile pentru rezistența la MFX și LFX au șanse mai mari de a avea insucces la regimurile aplicate pentru tratamentul TB-MDR. Tulpinile de *Mtbc* care au prezentat mutații în genele responsabile pentru rezistența la MFX, LFX și PZA au fost găsite drept responsabile pentru rezultatul nefavorabil la tratamentul tuberculos (eșec și deces în urma progresării procesului tuberculos). Rezultatul nefavorabil la tratamentul tuberculos (eșec și deces în urma progresării procesului tuberculos) printre persoanele care au prezentat mutații în genele responsabile pentru rezistența la MFX, LFX și PZA nu a fost asociat cu careva dintre factorii demografici, sociali sau clinici.

4 ANALIZA FILOGENETICĂ ȘI IDENTIFICAREA CLUSTERELOR DE TRANSMITERE

În cadrul studiului s-a urmărit prospectiv detectarea evenimentele de transmitere a tulpinilor TB RR/MDR în cadrul spitalului și s-a efectuat o analiză detaliată a suprapunerii fiecărui pacient dintr-o anumită secție, salon sau în spital pentru fiecare zi a anului. Pe durata studiului am reușit să identificăm care dintre cei 307 pacienți internați cu TB RR/MDR au fost inițial spitalizați într-o altă secție decât cea conform spectrului de rezistență care potențial ar putea duce la transmiterea nosocomială către alți pacienți cu TB sensibilă la medicamente sau la pacienți cu boli non-TB în această perioadă. Patruzeci și unu dintre pacienții cu TB RR/MDR s-au aflat timp de 631 de zile din momentul internării într-o secție non-MDR până când li s-a identificat TB rezistentă la medicamente, în urma căreia pacienții au fost transferați în secția MDR [18].

Folosind metoda de secvențiere a întregului genom micobacterian pe toate tulpinile TB RR/MDR de la pacienții cu indice presupus și de la pacienții cu TB sensibilă la medicamente care au dezvoltat ulterior TB RR/MDR în timpul monitorizării, s-au identificat 2 evenimente de transmitere foarte probabilă, care indică o rată scăzută de transmitere nosocomială a tulpinilor TB RR/MDR și care confirmă constatările anterioare a studiului retrospectiv desfășurat în țară [9]. Cu toate acestea, constatările noastre sunt limitate datorită clonalității ridicate a tulpinilor *Mtbc* la pacienții cu TB RR/MDR, în special, în genotipul Ural. Migrarea pacienților în spital a fost investigată detaliat, fiind identificate doar două evenimente de transmitere nosocomială. Prin urmare, transmiterea nosocomială a TB RR/MDR în Republica Moldova este mult mai scăzută comparativ cu transmiterea extraspitalicească.

Cu toate că pacienții cu TB RR/MDR au fost internați din diverse motive în secții non-MDR, care, de fapt, este una cu expunere semnificativă, transmiterea nosocomială este puțin probabilă. Rata foarte mică de transmitere nosocomială sugerează că măsurile de izolare existente, inițierea tratamentului TB RR/MDR și managementul cazului de TB în spital sunt destul de eficiente. Astfel, transmiterea nosocomială nu este un factor de răspândire a TB RR/MDR așa cum se credea anterior [24], iar măsurile de control al transmiterii TB ar trebui concentrate asupra comunității.

Capacitatea de secvențiere a întregului genom micobacterian pentru a urmări cu încredere evenimentele de transmitere directă pe baza distanței genetice, în cadrul

studiului nostru, este limitată de clonalitatea ridicată a celor 2 grupuri cu prevalență ridicată (Beijing și Ural), unde 92% dintre tulpinile TB RR/MDR din Republica Moldova aparțin acestor 2 grupuri de transmitere [25]. Majoritatea legăturilor epidemiologice presupuse, bazate pe măsurarea distanței genetice (≤ 5 SNP-uri între izolatele pacienților), au trebuit să fie excluse din cauza lipsei suprapunerilor spitalicești a pacienților.

4.1 Deducerea evenimentelor de transmitere de la pacient la pacient

În scopul identificării transmițerii tulpinii TB RR/MDR de la un pacient la altul s-a utilizat distanță maximă între perechi între două tulpini de TB RR/MDR care au până la 5 SNP-uri diferențe, pentru a identifica clusterelor moleculare ca marker surogat pentru transmiterea recentă a tulpinilor TB RR/MDR [26]. O posibilă transmitere directă între pacienții internați cu TB RR/MDR și a „pacienților focus” a fost dedusă atunci când ambele izolate aparțineau aceluiași grup molecular și împărtășeau profiluri genotipice identice de rezistență la medicamentele anti-tuberculoase. Pentru a vizualiza tulpinile de *Mtbc* de la pacienții care au dobândit TB RR/MDR în spital, s-a efectuat o analiză de tip secvență multi-locus a genomului central (cgMLST), așa cum a fost descris anterior în studiul lui Kohl TA și coaut. [27], cu SeqSphere v8.4 care clasifică clusterelor cgMLST pe baza <1 alele, distanța în perechi între oricare două izolate.

4.2 Analiza epidemiologică moleculară

În timpul monitorizării, s-au identificat 19 pacienți („pacienți focus”) cu tulpini TB non-RR/MDR la etapa de spitalizare și ulterior depistarea unei tulpini TB RR/MDR. În două cazuri nu a fost posibilă izolarea ADN-ului genomic, respectiv, în analiză au rămas 17 „pacienți focus”. Procesul de reinfectare a fost confirmat de o distanță genetică între cele două tulpini de maxim de 12 SNP-uri. Timpul mediu de la izolarea tulpinii TB non-RR/MDR până la izolarea tulpinilor TB RR/MDR de la acești 17 „pacienți focus” a fost de 215 [IQR 48-301] zile [18].

Unul dintre cei 144 de contacți din saloane, dintre cei 41 de pacienți cu TB RR/MDR internați inițial într-o secție non-MDR, se afla în același salon cu unul dintre cei 17 „pacienți-focus” care a dobândit potențial TB RR/MDR [18]. În scopul clarificării potențialelor dobândiri de TB RR/MDR, am investigat grupurile moleculare și profilurile de rezistență la preparatele antimicobacteriene pentru a identifica presupusele contacte cu tulpinile TB RR/MDR. Ulterior, s-au urmărit suprapunerile la nivel de spital, secție și saloane până când „pacienții focus” au fost diagnosticați cu tuberculoză TB RR/MDR. Dintre cei 297 de pacienți cu TB RR/MDR confirmați prin metode culturale la înrolarea în studiu și cei 17 „pacienți focus” care au avut o presupusă reinfectie cu tulpini TB RR/MDR în timpul monitorizării, s-au putut genera 274 de ADN-uri care au fost supuse procesului de secvențiere (40 de tulpini TB RR/MDR nu a putut fi recrescute din biobancă). În cazul a 6 izolate de ADN genomic, probele au fost contaminate cu ADN-ul de la alte micobacterii și aceste mostre de ADN au fost excluse din analizele ulterioare, lăsându-se în analiza finală 268 de ADN-uri. Analiza epidemiologică moleculară, a inclus cohorta TB RR/MDR și toate cele 17 tulpini de la pacienții care ulterior au fost identificați cu tulpini TB RR/MDR.

4.3 Secvențierea integrală a genomului micobacterian și analiza distanței genetice spațiale

Populația bacteriană a cuprins izolate de *Mtbc*, în majoritatea absolută, a două genotipuri: linia 2 în 43,3% (116/268) cazuri și izolate din linia 4 în 56,7% (152/268) cazuri. În literatura de specialitate sunt descrise rezultatele studiilor efectuate anterior cu referire la circulația genotipului Beijing (lineage 2) care a fost identificat în mai multe țări cu incidență ridicată a TB RR/MDR din Europa de Est, Federația Rusă și Asia Centrală [28]. ADN-urile izolate tipizate din lineage 2 au fost ramificate în următoarele sublinii: Beijing Asia Centrală în 57,8% (67/116) cazuri, Beijing Europa/Rusia W148 Outbreak în 21,6% (25/116) cazuri și Beijing Asia Centrală Outbreak în 18,1% (21/116) cazuri, în timp ce lineage 4 a cuprins, aproape exclusiv, toată divizarea de 4.2.1 sublineage a genotipul Ural 139/152 de cazuri (91,4%), menționate în Fig. 4.1 [18].

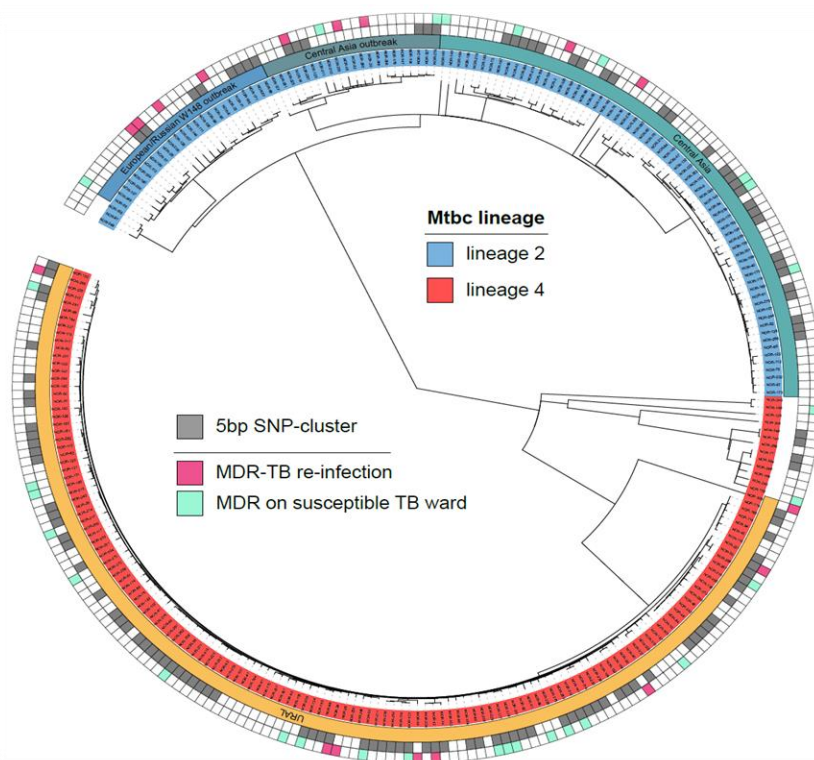


Fig. 4.1. Filogenia de probabilitate maximă a 268 de izolate TB RR/MDR

Analizând filogenia de probabilitate, observăm pătratele gri reprezentând ADN-ul micobacterian izolat al pacienților cu o distanță genetică maximă de polimorfism de 5 nucleotide unice, ca surrogat pentru transmiterea recentă, iar pătratele roz indică pacienții care au dobândit o nouă tulpină TB RR/MDR, descrise în Fig. 4.2.

În descrierea analizei de secvențiere s-a folosit datele secvenței pentru a prezice fenotipul de rezistență în baza asocierii directe cu SNP-uri care conferă rezistență descrisă anterior [29]. În întreaga cohortă TB RR/MDR, ratele de rezistență la medicamente au fost extrem de ridicate pentru STM în 92,2% (247/268) cazuri, EMB în 61,6% (165/268) cazuri, PZA în 49,3% (132/268) cazuri, ETH/PRO în 87,3% (234/268) cazuri și KAN în 67,5% (181/268) cazuri. În cele 268 de izolate de TB RR/MDR, am identificat mutații care conferă rezistență la LFX în 26,5% (n=71) și MFX în 25,4% (n=68) cazuri, la PAS în 22,8% (n=61) cazuri, la CAP în 13,8% (n=37)

cazuri, la AMK în 13,1% (n=35) cazuri, iar la D-cicloserina în 6,0% (n=16) cazuri dintre izolate analizate. Analizând distribuția geografică a tulpinilor din ambele linii: linia 2 Beijing și linia 4 Ural, s-a observat o distribuție uniformă în toate raioanele țării.

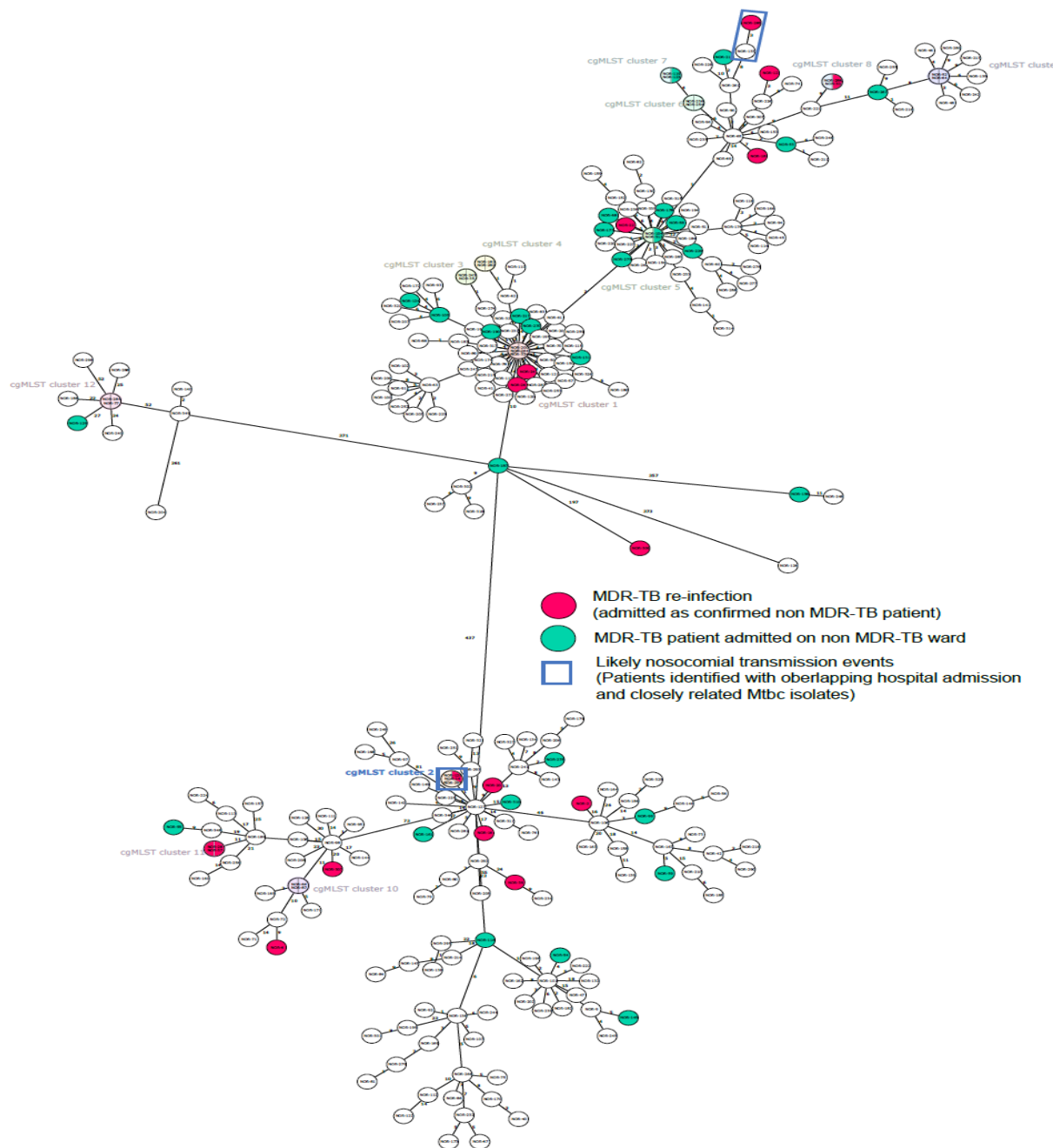


Fig. 4.2. Rețeaua filogenetică reprezentând relația genomică a tuturor izolatelor de la pacienți pe baza unei analize de tip secvență multilocus genomului de bază (cgMLST)

S-a identificat un pacient care a fost plasat în cel mai mare grup unic, incluzând 53 de izolate din grupul 4.2.1 a genotipul Ural (cluster 26), presupunând inițial un scenariu extins de transmitere nosocomială în curs de desfășurare, după cum este în Fig. 4.3 [18].

Pacienții care potențial au dobândit TB RR/MDR sunt afișați în roz, pacienții cu TB RR/MDR internați inițial într-o secție non-MDR sunt afișați cu verde, iar identificarea probabilă a evenimentelor de transmitere nosocomială sunt evidențiate cu

o căsuță albastră. Cu toate acestea, având în vedere diversitatea genetică scăzută a genotipului dominant 4.2.1 Ural în filogenie (Fig. 4.2), trebuie să presupunem că aceste tulpini sunt foarte răspândite în Republica Moldova în afara spitalului. În plus, acești pacienți nu au avut nici o suprapunere identificată în spital cu alți pacienți din cohorta TB RR/MDR. În general, 124/268 (46,3%) de pacienți au făcut parte din unul dintre cele 28 de grupuri identificate, inclusiv 7/17 din „pacienți focus” [18].

Scenariul de transmitere nosocomială. Pentru a evidenția evenimentele presupuse de transmitere între „pacienții focus,” și pacienții internați concomitent cu TB RR/MDR, a fost efectuată o analiză a grupului molecular, dintre toate izolatele, bazată pe distanța genetică în perechi.

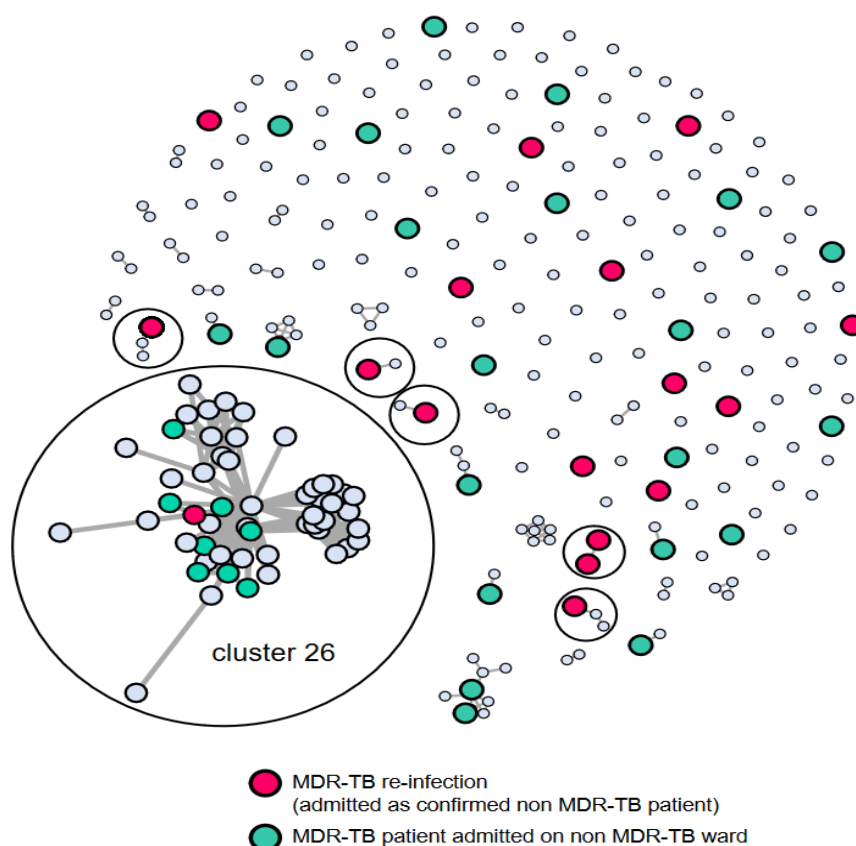


Fig. 4.3. Analiza grupului molecular bazat pe distanța genetică

Punctele singleton nu au o legătură între pacienții din studiu. Cercurile gri deschise indică grupuri cu TB RR/MDR dobândită (puncte roșii) sau TB RR/MDR pe secția susceptibilă (puncte turcoaz).

Cohorta „pacienților focus” a fost analizată din punct de vedere a structurii genotipului și a potențialelor surse de infecție, identificând în proporție de peste 88% schimbarea genotipului acelorași pacienți din cohorta non-MDR în cohorta MDR, pe când doar în 2 cazuri genotipurile din ambele cohorte au rămas neschimbate (n=1 Beijing CA, n=1 Ural). Analizând cohorta non-MDR a genotipului Beijing Central Asia (n=8), observăm că în 50% cazuri (4/8) în cohorta MDR pacienții au achiziționat genotipul Ural, în 25% cazuri (2/8) genotipul în cohorta MDR este Beijing European/Russian W148 outbreak, iar în proporție egală de 12,5% cazuri a achiziționat genotipul Beijing Central Asia outbreak și în același procent de cazuri nu și-a schimbat genotipul. Cercetând cohorta non-MDR a genotipului H37Rv-like (n=4), observăm că

în 50% cazuri (2/4), în cohorta MDR, acești pacienți au achiziționat genotipul Beijing European/Russian W148 outbreak, și respectiv câte 25% cazuri au dezvoltat tulpina MDR cu genotipul Beijing Central Asia outbreak (1/4) și respectiv Ural (1/4).

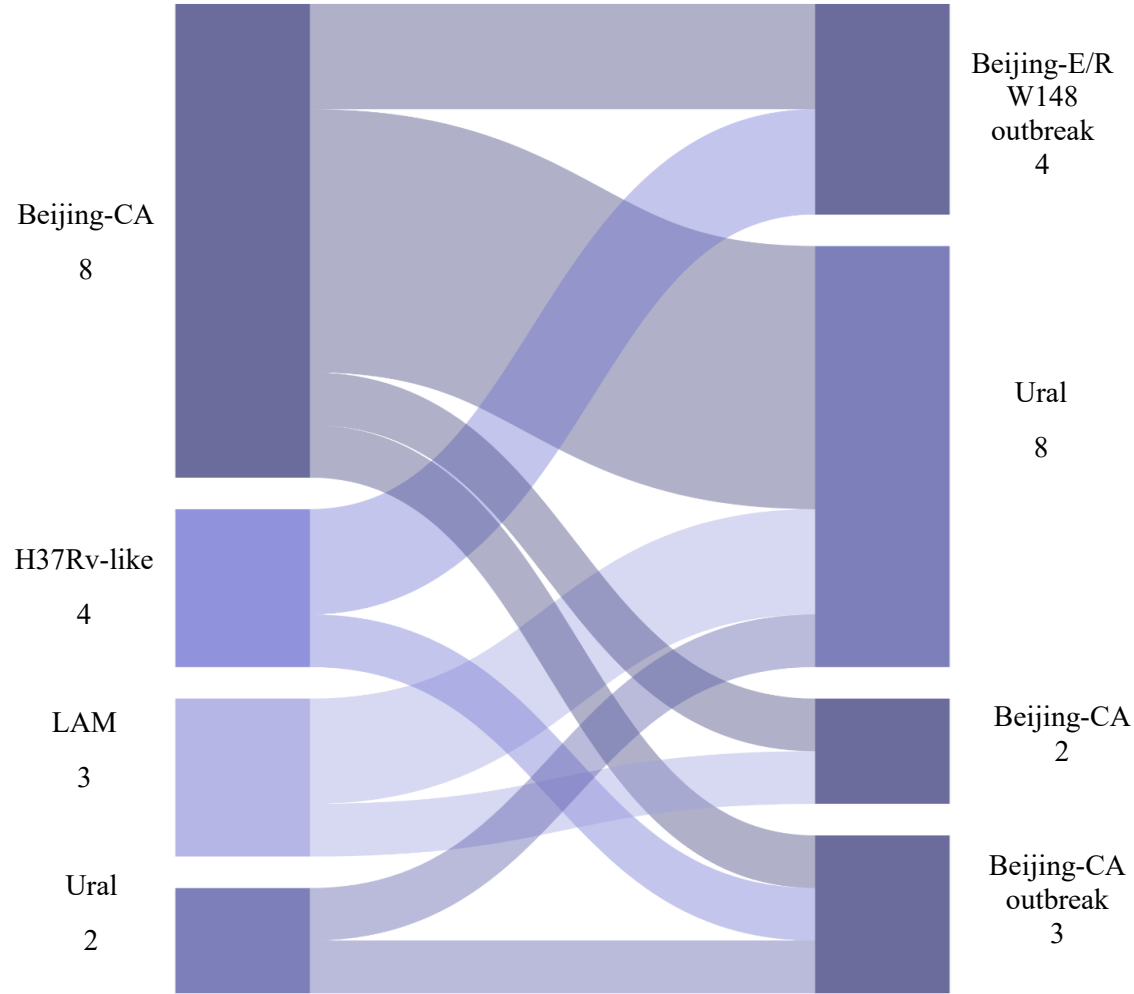
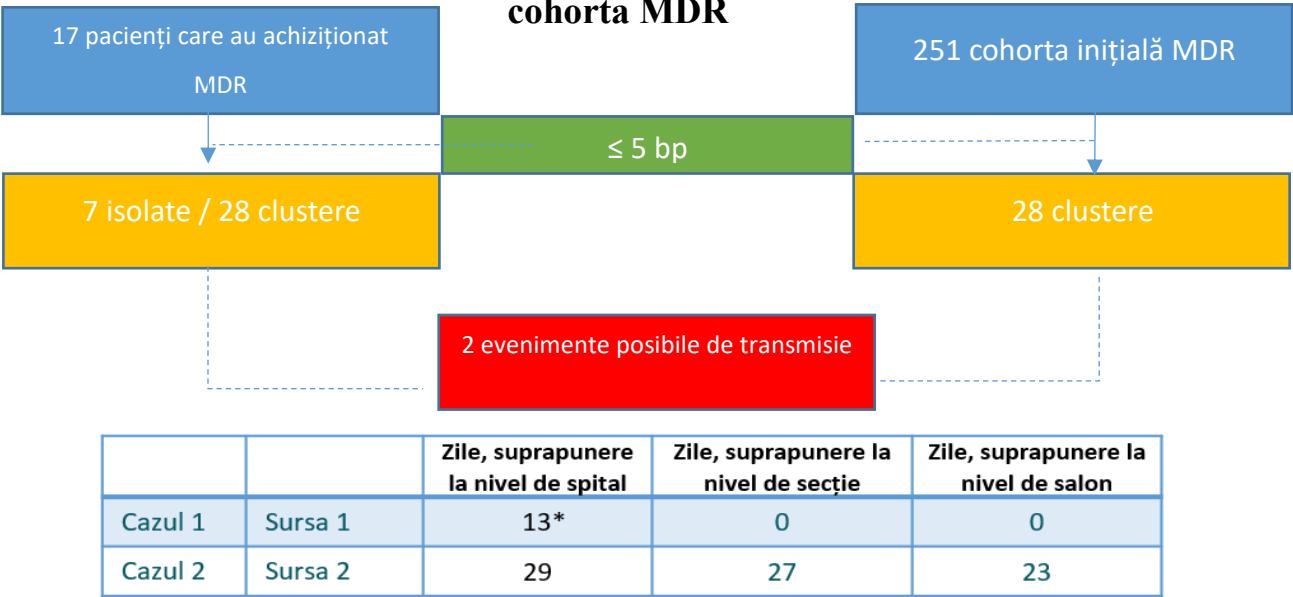


Fig. 4.4. Distribuirea genotipurilor pacienților focus în cohorta non-MDR și cohorta MDR



*pacienții au stat deja în spital cu 52 de zile înainte de începerea oficială a studiului

Fig. 4.5. Evenimente probabile de transmitere nosocomială

În concluzie, putem afirma că în proporție de aproximativ 47,0% dintre pacienții care au achiziționat o altă tulpină a fost din grupul genotipului Ural, 23,5% din grupul Beijing European/Russian W148 outbreak, în 17,6% au făcut parte din grupul Beijing Central Asia outbreak, iar 11,9% au aparținut grupului Beijing Central Asia.

În baza analizei studiului s-a determinat că doi pacienți au fost re-infectați cu aceeași tulpină pre-XDR (cluster 28), găzduind mutații identice ce mediază rezistența, dar fără suprapuneri de spital. De asemenea, un alt caz posibil de reinfecție nosocomială (cluster 27) cu implicarea unui „pacient focus” infectat cu aceeași tulpină (diferență 0 SNP) nu a fost plauzibil din cauza absenței suprapunerii perioadelor de spitalizare [18].

Se reliefează faptul că în perioada anterioară studiului și în timpul studiului s-a produs o consolidare importantă a acestor intervenții. Aceasta ar putea fi unul dintre factorii care contribuie la reducerea transmiterii spitalicești și la o incidență mai mică a acestor fenomene în timpul studiului decât cea așteptată.

Secvențierea întregului genom micobacterian deduce cu încredere evenimentele de transmitere directă pe baza distanței genetice, dar în cadrul studiului nostru a fost limitată de clonalitatea ridicată a celor 2 grupuri cu prevalență ridicată (Beijing și Ural), unde 92% dintre tulpinile TB RR/MDR din Republica Moldova aparțin acestor 2 grupuri de transmitere [25]. Majoritatea legăturilor epidemiologice presupuse, bazate pe măsurarea distanței genetice (≤ 5 SNP-uri între izolatele pacienților), au trebuit să fie excluse din cauza lipsei suprapunerilor spitalicești a pacienților.

5 EVALUAREA CUNOȘTINȚELOR EPIDEMIOLOGICE ÎN DOMENIUL CONTROLULUI INFECȚIEI TB PRIN CHESTIONAREA PERSONALULUI MEDICAL CE ACTIVEAZĂ ÎN INSTITUȚIA MEDICALĂ

Acest capitol a avut drept obiectiv de a evalua cunoștințele și practicile lucrătorilor medicali care activează în cadrul IFP. Personalul medical a fost reprezentat de medici (ftiziopneumologi și pneumologi) în 12,5% (n=7) cazuri și de asistenți medicali în 87,0% (n=49) cazuri. Informația prezentată în capitol descrie rezultatele obținute în cadrul chestionărilor și în baza cărora s-a determinat că personalul medical din cadrul IFP a dovedit cunoștințe vădite în aplicarea măsurilor de control al infecției TB, dar și un grad înalt în capacitatea acestora.

Stagiul mediu de muncă a personalului medical a fost de 21,5 (DS $\pm$ 12,06), mediana fiind de 21,0 ani, cel mai mic stagiul de muncă a fost de 1,5 ani, iar cel mai mare de 43 ani. În dependență de stagiul de muncă în domeniul medical, au menționat că activează în domeniu mai puțin de 10 ani – 23,2% (n=13), între 10 și 19 ani – 21,4% (n=12), între 20 și 29 ani – 23,2% (n=13), între 30 și 39 ani - 23,2% (n=13) și peste 40 de ani – 8,9% (n=5) dintre personalul medical care a participat la studiu. Dacă este să ne referim la secțiile clinice în care activează, mai mult de jumătate (58,9%; n=33) dintre personalul medical a indicat că activează în secțiile de TB non-MDR (sau în FP-1, FP-2 și Chirurgie activau câte 11 dintre personal), în 23,2% (n=13) aceștia au indicat că activează în secția MDR, iar 17,9 (n=10) – în secția non-TB (sau FP-3).

Toți participanții la studiu (100%, n=56) au menționat că în cadrul instituției în care activează (IFP) există un program și un plan de control al infecțiilor, că posedă

cunoștințe privind controlul infecției și că au participat la instruiți privind prevenirea și controlul infecției în domeniul TB. Despre existența unui grup tehnic de lucru care activează în domeniul de control al infecțiilor a fost specificat în 94,6% cazuri (n=54). Majoritatea (67,9%; n=38) dintre personalul medical au participat la instruiți în domeniul prevenirii și controlului infecțiilor în contextul TB în anul curent, 28,6% (n=16) au participat la instruiți cu doi ani în urmă, iar 3,6% (n=2) cu trei ani în urmă.

Personalul medical care activează în secțiile clinice ale IFP consideră că secția în care activează este pregătită pentru un focar de infecție (98,2% [ÎI95%: 94,75-100,00]). În aceeași măsură (98,2% [ÎI95%: 94,75-100,00]), personalul medical a menționat următoarele cauze ale focarelor de infecții în cadrul asistenței medicale spitalizate, precum: 1) încălcarea politicilor, regulilor și liniilor directoare de control al infecțiilor; 2) lipsa politicilor, regulilor, cât și a liniilor directoare clare de control al infecțiilor; 3) neatenția lucrătorilor din domeniul sănătății; 4) lipsa echipamentului adecvat de protecție personală; 5) lipsa infrastructurii privind respectarea controlului infecției în domeniul TB.

Dintre factorii care contribuie la răspândirea infecției tuberculoase în spital au fost specificați: 1) structura și infrastructura clădirii spitalului (98,2% [ÎI95%: 94,75-100,00]); 2) lipsa sau deficitul de personal medical instruit (96,4% [ÎI95%: 91,57-100,00]); 3) lipsa instruirilor privind controlul infecțiilor (98,2% [ÎI95%: 94,75-100,00]); 4) lipsa sau deficitul resurselor pentru îndeplinirea cerințelor cât și a nevoilor de control al infecțiilor (96,4% [ÎI95%: 91,57-100,00]).

Evaluarea percepției expunerii riscului de a achiziționa TB a fost analizată din trei perspective, cum ar fi: risc în cadrul instituției medicale în care activează (IFP), risc în cadrul sistemului spitalicesc în general și risc în comunitate. Astfel, personalul medical din cadrul IFP consideră că sunt supuși riscului de infectare cu TB în 12,5% [ÎI95%:3,84-21,16] cazuri (risc maxim). În același timp, jumătate (48,2% [ÎI95%:35,13-61,30]) dintre personal consideră că riscul este minim, iar 39,3% [ÎI95%:26,49-52,08]) că riscul este unul relativ mic. Cu referire la riscul de infectare cu TB în sistemul spitalicesc (în general) și în comunitate, personalul medical consideră că acesta este unul minim. Despre acest fapt au specificat majoritatea dintre personal medical chestionat (60,7% [ÎI95%:47,92-73,51] și 67,9% [ÎI95%:55,63-80,09]).

CONCLUZII GENERALE

1. Implementarea măsurilor de control al infecției în spitalele de profil din republică a stopat transmiterea nosocomială a infecției tuberculoase, în primul rând cu germeni rezistenți la medicamente și a redus substanțial numărul acestor forme de tuberculoză printre pacienții noi depistați.
2. Aplicarea metodelor de secvențiere a genomului întreg pe tulpini a *Mtbc* au identificat 2 cazuri probabile de transmitere (2/567), ceea ce indică o rată scăzută de transmitere nosocomială a tulpinilor de *Mtbc* RR/MDR în cadrul spitalului în care s-a desfășurat studiul.
3. Prezența mutațiilor genice responsabile de rezistența la medicamentele utilizate pentru tratamentul TB a fost determinată la 13 dintre 17 medicamente

antituberculoase supuse analizei și care variază de la 100% (INH și RIF, medicamente de linia I) la 6,0% (CS, medicament de linia II). Nu au fost identificate mutații la nivel de gene responsabile de rezistența la CFZ, LZD, BDQ și DLM, ceea ce conferă încredere în aplicarea regimurilor noi, recomandate recent de către OMS pentru tratamentul TB rezistente, de scurtă durată.

4. Rezultatele tratamentului anti-tuberculos pentru pacienții cu TB RR/MDR au înregistrat un succes la tratament de la 63,4% în 2016 la 72,6% în 2020. Analiza bivariată a determinat că tulpinile de *Mtbc* care au prezentat mutații în genele responsabile pentru rezistența la MFX și LFX au șanse mai mari de a avea insucces la regimurile actuale aplicate pentru tratamentul TB RR/MDR.
5. Capacitatea WGS de a deduce cazurile de transmisie directă pe baza distanței genetice este una limitată din cauza clonalității ridicate a unor grupuri cu prevalență ridicată, unde 92% dintre tulpinile TB RR/MDR din Republica Moldova aparțin unor grupuri presupuse de transmitere. Rețelele largi de transmitere bazate pe asemănarea genomică au arătat că >85% din toate cazurile de TB cu cultură pozitivă ar putea fi cartografiate în grupuri presupuse de transmitere și că majoritatea (>54%) dintre aceste cazuri au fost găsite în 35 de grupuri mari de transmitere.
6. Personalul medical din cadrul instituției spitalicești de profil a dovedit un nivel înalt de cunoștințe în aplicarea măsurilor de control al infecției TB.

RECOMANDĂRI

1. Trierea riguroasă a pacienților înainte de spitalizare în staționarele de profil.
2. Reducerea duratei de spitalizare în secțiile de TB, în special, cele destinate pentru pacienții cu TB RR/MDR prin promovarea tratamentului în condiții de ambulatoriu.
3. Reevaluarea și aplicarea criteriilor de internare în secțiile de ftiziopneumologie, dar și a principiilor de amplasare a pacienților, inclusiv evitarea transferurilor între secțiile non-MDR și MDR, fără indicații clinice elocvente.
4. Revizuirea planului național privind controlul infecției în TB la toate nivelele, inclusiv în staționarele de TB, instituțiile de ambulatoriu care prestează servicii pentru TB, dar și la nivel comunitar.
5. Pregătirea continuă a personalului medical din cadrul serviciului de ftiziopneumologie (staționar și ambulatoriu), dar și a personalului medical care activează la nivel comunitar, inclusiv prin dezvoltarea curiculei de studii, materialelor informaționale, instruiți, etc.
6. Evaluarea periodică a lucrătorilor medicali privind aplicarea metodelor de control al infecțiilor în cadrul staționarelor, ambulatoriu, etc.

BIBLIOGRAFIE

1. *Global tuberculosis report 2022*. Geneva: World Health Organization 2022.ISBN:978-92-4-006172-9.
2. *Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015*. United Nations 2015.
3. *The End TB Strategy*. World Health Organization 2015.WHO/HTM/TB/2015.19.
4. *WHO global lists of high burden countries for tuberculosis (TB), TB/HIV and multidrug/rifampicin-resistant TB (MDR/RR-TB), 2021–2025: background document*. Geneva: World Health Organization 2021.ISBN 978-92-400-2944-6.
5. *Roadmap to implement the tuberculosis action plan for the WHO European Region 2016–2020*. Geneva: World Health Organization 2020.ISBN 978-92-890-5169-9.
6. ESTEBESOVA A. *Systematic Review of Infection Prevention and Control Policies and Nosocomial Transmission of Drug-Resistant Tuberculosis*. School of Public Health 2013.
7. CLAASSENS, M.M., VAN SCHALKWYK, C., DU TOIT, E., ROEST, E. et al. Tuberculosis in healthcare workers and infection control measures at primary healthcare facilities in South Africa. In: *PLoS One*. 2013 Oct; nr. 8(10), pp. 762-772. ISSN 1932-6203.
8. *WHO policy on TB infection control in health-care facilities, congregate settings and households*. Geneva: World Health Organization 2009.ISBN 978-92-4-159832-3.
9. CRUDU, V., MERKER, M., LANGE, C., NOROC, E. et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis. In: *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2015; nr. 19(12), pp.1520-1523. ISSN 1027-3719.
10. *Global investments in tuberculosis research and development: past, present and future. A policy paper prepared for the first WHO global ministerial conference on ending tuberculosis in the sustainable development era: a multisectoral response*. Geneva: World Health Organization 2017.ISBN 978-92-4-151332-6.
11. LIENHARDT, C., GLAZIOU, P., UPLEKAR, M., LONNROTH, K. et al. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. In: *Nature Reviews Microbiology*. 2012 May; nr.10(6), pp. 407-416. ISSN 1740-1526.
12. LONNROTH, K., CASTRO, K.G., CHAKAYA, J.M., CHAUHAN L., S., et al. Tuberculosis control and elimination 2010–50: cure, care, and social development. In: *Lancet*. 2010 May; nr. 375(9728), pp.1814-1829. ISSN 0140-6736.
13. *Global tuberculosis control 2009*. Geneva: World Health Organization 2009.ISBN 978-92-4-159886-6.

14. JAMISON, D. T., BREMAN, J. G., MEASHAM, A. R., ALLEYNE, G. et. al. *Disease control priorities in developing countries*. 2nd ed. Washington (DC): Oxford University Press; 2006 ISBN-10: 0-8213-6179-1.
15. BROWN, T. S., ELDHOLM, V., BRYNILDSRUD, O., OSNES, M. et al. Evolution and emergence of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Chisinau, Moldova. In: *Microb Genom*. 2021 Aug; nr. 7(8):000620. ISSN 2057-5858.
16. HG nr.107 Privind aprobarea Programului național de răspuns. 2022.
17. WHO guidelines on tuberculosis infection prevention and control, 2019 update. 2019.ISBN 978-92-4-155051-2.
18. NOROC, E., CHESOV, D., MERKER, M., GROSCHEL, M.I. et. al. Limited Nosocomial Transmission of Drug-Resistant Tuberculosis, Moldova. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2023 Mai; vol. 29. doi: 10.3201/eid2905.230035.
19. DOMENTE, L., ALEXANDRU, S., IAVORSCHI, C. și al. Protocol clinic național. Tuberculoza la adult. 2012.
20. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update. 2022.ISBN 978-92-4-006313-9.
21. VALFAR, S.J. Systematic Review of Mutations Associated with Isoniazid Resistance Points to Continuing Evolution and Subsequent Evasion of Molecular Detection, and Potential for Emergence of Multidrug Resistance in Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2021 March; nr. 65(3). DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.02091-20>.
22. LI, M. et al. rpoB Mutations and Effects on Rifampin Resistance. In: *Infection and Drug Resistance*. 2021 October; vol. 14, pp. 4119-4128. DOI: 10.2147/IDR.S333433.
23. SATISH, K., LINGARAJA, J. Understanding Rifampicin Resistance in Tuberculosis through a Computational Approach. In: *Genomics & Informatics*. 2014 December; nr. 12(4), pp. 276-282. ISSN 2234-0742.
24. BROWN, T.S., ELDHOLM, V., BRYNILDSRUD, O., OSNES, M. et al. Evolution and emergence of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Chisinau, Moldova. In: *Microbial Genomics*. 2021 Aug; nr. 7(8):000620. ISSN 2057-5858.
25. YANG, C., SOBKOWIAK, B., NAIDU, V. et al. Phylogeography and transmission of *M. tuberculosis* in Moldova: A prospective genomic analysis. 2022 Feb; nr. 19(2), pp. e1003933. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003933>.
26. WALKER, T.M., IP, C.L., HARREL, R.H., EVANS, J.T. et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. In: *Lancet Infect Disease*. 2013 Feb; nr.13(2), pp. 137-46. ISSN 1201-9712.
27. KOHL, T.A., DIEL, R., HARMSSEN, D.R. et al. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. 2014 Jul; nr. 52(7), pp. 2479-2486.

28. MERKER, M., RASIGADE, J.P., BARBIER, M. et al. Transcontinental spread and evolution of Mycobacterium tuberculosis W148 European/Russian clade toward extensively drug resistant tuberculosis. 2022 Aug; nr. 13(1), pp. 5105.
29. GROBBEL, H.P., MERKER, M., KOHLER, N. et al. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. 2021 Oct; nr. 73(7), pp. 1194-1202. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab359>.
30. *Guidelines for the surveillance of drug resistance in tuberculosis*. Geneva: World Health Organization 2020. ISBN 978-92-4-001803-7.
31. CUEVAS-CORDOBA, B. et al. rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis from Mexico. In: *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2013 February; nr. 46(1). <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.08.020>.
32. BWALYA Pea. Characterization of Mutations Associated with Streptomycin. In: *Antibiotics*. 2021 October; nr. 10(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101169>.
33. TUDO Gea. Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the area of Barcelona. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 November; nr. 65(11), pp. 2341-2346. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq322>.
34. HLAING YMea. Mutations in Streptomycin Resistance Genes and Their Relationship to Streptomycin Resistance and Lineage of Mycobacterium tuberculosis Thai Isolates. In: *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2017 March; nr. 80(2), pp. 159-168. DOI: <https://doi.org/10.4046/trd.2017.80.2.159>.

LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI

1. Articole în reviste științifice

1.1. în revistele din bazele de date Web of Science și SCOPUS

- 1.1.1. CRUDU, V. et al. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis. In: *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2015, no.19(12), pp.1520-1523. **IF 2,148**.
- 1.1.2. COLMAN, R. E. et al. Detection of Low-Level Mixed-Population Drug Resistance. *Mycobacterium tuberculosis* Using High Fidelity Amplicon Sequencing. In: *PLOS ONE*. 2015, no.10(5), pp. 1-18. **IF 3.234**.
- 1.1.3. MANSON, A.L. et al. Genomic analysis of globally diverse *Mycobacterium tuberculosis* strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance. In: *Nature Genetics*. 2017, vol. 49(3), pp. 395-402. PMCID: PMC5402762 **IF 27,125**.
- 1.1.4. BROWN, T. S. et al. Evolution and emergence of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Chisinau, Moldova. In: *Microbial Genomics*. 2021, no. 8(7), pp. 1-9. ISSN 2057-5858. **IF 4,70**.
- 1.1.5. FINCI, I. et al. Genotype to phenotype: variable resistance levels in clinical *Mycobacterium tuberculosis complex* strains caused by resistance mutations. In: *The Lancet Microbe*. 2022, vol. 3, issue 9, e672-e682. **IF 38,2**.
- 1.1.6. NOROC, E. et al. Limited nosocomial transmission of drug-resistant-tuberculosis, R. Moldova. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2023, vol. 29, no. 5, pp.1046-1050. ISSN: 1080-6059. **IF 16,126**.

1.2. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei: - categoria B

- 1.2.1 CRUDU, V. ș.a. Versiunea nouă a metodei molecular-genetice pentru detecția tuberculozei, precum și a rezistenței la rifampicină și izoniazidă (Line probe assay genotype MTBDRplus VER2.0). În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău, 2012, nr. 4(36), pp. 40-44. ISSN 1857-0011.
- 1.2.2 CIOBANU, N. ș.a. Nivelul de rezistență fenotipică și paternul de mutații genice a *M. tuberculosis*. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău, 2021, nr. 1(69), pp. 38-44. ISSN 1857-0011.

2. Teze în culegeri științifice

2.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

- 2.1.1 CRUDU, V. et al. Transmission of *mycobacterium tuberculosis* Ural 163-15 lineage causing multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients. In: *European Respiratory Journal*. 2022, vol. 46 (suppl 59), p. 2739. Print ISSN 0903-1936. Online ISSN 1399-3003. **IF 7.636**.
- 2.1.2 CIOBANU, N. et al. The TB eXiSt assay for improvement the accuracy of diagnosis of TB resistance cases. The 47th Union World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). In: *The International Journal of Tuberculosis and*

Lung Disease. Liverpool, United Kingdom, 2016, vol. 20(11 suppl 1), p. 487. ISSN 1027-3719. **IF 2.468**.

- 2.1.3 MERKER, M. et al. The impact of mixed infections on the interpretation of molecular epidemiology studies of tuberculosis. In: *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2016, vol. 20(suppl 3), p. 424. **IF 2.468**.
- 2.1.4 CIOBANU, N. et al. The correlation of genotypic resistance with phenotypic level of drug resistance for guiding treatment decisions. The 48th Union World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union), In: *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. Guadalajara, Mexico, 2017, vol. 21(11 suppl 2), p. 385. ISSN 1027-3719. **IF 2.392**.
- 2.1.5 CRUDU, V. et al. Discrepancy across phenotypic and genotypic results of drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *European Respiratory Journal*. 2018, vol. 52 (suppl 62), p.3675. Print ISSN 0903-1936. Online ISSN 1399-3003. **IF 12.244**.
- 2.1.6 NOROC, E. et al. Uncertainty of hospital or community MDR-TB reinfection in patients on TB treatment in high MDR-TB burden setting. In: *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2022, vol. 26 (suppl 2), p.147. ISSN 997-1098. **IF 4.0**.
- 2.1.7 CRUDU, V. et al. Diagnostic accuracy of molecular assays for drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* using raw sputum and isolates strains. In: *European Respiratory Journal*. 2022, vol. 60(66), p. 2618. Print ISSN 0903-1936. Online ISSN 1399-3003. **IF 24,3**.

3. Brevete de invenție și alte obiecte de proprietate intelectuală (OPI)

- 3.1. **NOROC, E. ș.a.** *Izolarea ADN-ului genomic micobacterian prin tehnica CTAB pentru utilizarea în metoda de secvențiere integrală a genomului*. Certificat de inovator, Nr. 6011 din 27.03.2023.
- 3.2. **NOROC, E. ș.a.** *Izolarea ADN-ului genomic micobacterian prin tehnica CTAB pentru utilizarea în metoda de secvențiere integrală a genomului*. Act de implementare, Nr. 41 din 05.05.2023.

ADNOTARE

Noroc Ecaterina

„Evaluarea și prioritizarea factorilor de risc în transmiterea tuberculozei rezistente la pacienții spitalizați”.

Teza de doctor în științe medicale, Chișinău, 2024

Structura tezei: introducere, cinci capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 241 de titluri, 17 anexe, 122 pagini de text de bază, 37 de figuri și 15 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 15 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: tuberculoza, multidrogrezistența, transmitere nosocomială, Ural, Beijing.

Scopul lucrării: evaluarea și prioritizarea factorilor de risc în transmiterea TB rezistente la pacienții spitalizați în Republica Moldova.

Domeniul de studiu: transmitere nosocomială, control al infecției TB.

Obiectivele cercetării: documentarea și evaluarea fenomenului de transmitere nosocomială a tuberculozei printre pacienții spitalizați pentru tratamentul specific în spitalul de profil; Identificarea mutațiilor genice care conferă rezistență la medicamentele anti-tuberculoase în tulpinile de *Mtbc* multidrogrezistente și evaluarea factorilor determinanți responsabili pentru insuccesul tratamentului; Analiza filogenetică și identificarea principalelor clustere responsabile de transmiterea nosocomială prin aplicarea metodelor de secvențiere integrală a genomului micobacterian și deducerea evenimentelor de transmitere directă bazată pe distanța genetică; Evaluarea cunoștințelor în domeniul controlului infecției în tuberculoză în rândul personalului medical care activează în spitalul de profil.

Noutatea și originalitatea științifică. Noutatea și originalitatea științifică derivă din complexitatea, unicitatea realizării studiului și a metodelor de secvențiere utilizate în identificarea potențialelor cazuri de tuberculoză nosocomială.

Rezultatele obținute. Secvențierea întregului genom (WGS) a fost efectuată din tulpinile TB RR/MDR pentru a identifica pacienții index presupuși ai pacienților spitalizați care au dezvoltat TB RR/MDR în timpul unei monitorizări de 2 ani. Supravegherea moleculară detaliată a pacienților a relevat o rată scăzută de transmitere nosocomială a tulpinilor TB RR/MDR în instituția spitalicească de nivel național. Nu au fost identificate mutații la nivel de gene responsabile de rezistența la 4 dintre medicamentele noi (Clofazimină, Linezolidă, Bedaquilină, Delamanid), ceea ce conferă încredere în aplicarea regimurilor noi de tratament. Insuccesul la tratament ar putea fi cauzat de prezența mutațiilor în genele responsabile pentru rezistența la unul din cele 2 medicamente anti-microbiene (Moxifloxacină și Levofloxacină).

Semnificația teoretică. Rezultatele studiului vor suplini cadrul normativ privind respectarea controlului infecției în sistemul spitalicesc și va contribui la respectarea tuturor normelor privind stoparea transmiterii nosocomiale a tuberculozei în sistemul spitalicesc.

Valoarea aplicativă. Cercetarea realizată va completa măsurile de control al infecției prin prisma măsurilor complexe orientate spre evitarea transmiterii nosocomiale a tuberculozei în instituțiile spitalicești. Materialele cercetării pot fi aplicate în cadrul instruirilor și creșterii capacității personalului medical.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării servesc bază privind reglementarea, păstrarea și fortificarea măsurilor de control al infecției în sectorul spitalicesc.

АННОТАЦИЯ

Норок Екатерина

«Оценка и приоритезация факторов риска передачи лекарственно-устойчивого туберкулеза у госпитализированных больных».

Диссертация доктора наук в области медицины, Кишинев, 2024 г.

Структура диссертации: введение, пять глав, общие выводы и рекомендации, библиография из 241 названий, 17 приложений, 122 страниц основного текста, 37 рисунков, 15 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 15 научных статьях.

Ключевые слова: туберкулез, множественная лекарственная устойчивость, внутрибольничный путь передачи, URAL, Beijing.

Цель статьи: оценка и приоритет факторов риска в передачи резистентного туберкулеза у госпитализированных пациентов в Республике Молдова.

Область исследования: внутрибольничный путь передачи, контроль туберкулеза.

Задачи исследования: документирование и оценка явления внутрибольничной передачи туберкулеза среди больных, госпитализированных для специфического лечения в специализированный стационар; Идентификация генных мутаций, обуславливающих устойчивость к противотуберкулезным препаратам у штаммов *Mtbc* с множественной лекарственной устойчивостью, и оценка детерминант, ответственных за неэффективность лечения; Филогенетический анализ и идентификация основных кластеров, ответственных за внутрибольничную передачу, с применением методов интегрального секвенирования генома микобактерий и выводом событий прямой передачи на основе генетической дистанции; Оценка знаний в области инфекционного контроля при туберкулезе у медицинского персонала, работающего в специализированном стационаре.

Научная новизна и оригинальность исследования. Научная новизна вытекает из сложности и уникальности исследования, а также методов секвенирования, используемых для выявления потенциальных случаев нозокомиального туберкулеза.

Результаты. Полногеномное секвенирование (WGS) было выполнено из штаммов ТБ с УР/МЛУ для выявления пациентов с предполагаемым индексом госпитализированных пациентов, у которых развился ТБ с УР/МЛУ в течение 2 лет наблюдения. Детальное молекулярно-генетическое исследование выявило низкий уровень нозокомиальной передачи штаммов ТБ с УР/МЛ в условиях национальной больницы. Не выявлено мутаций на уровне генов, ответственных за устойчивость к 4 новым препаратам (клоfazемин, линезолид, бедаквилин, деламаид), что дает уверенность в применении новых схем лечения. Неэффективность лечения могла быть обусловлена наличием мутаций в генах, ответственных за резистентность к 2 противомикробным препаратам (моксифлоксацин и левофлоксацин).

Теоретическая значимость. Результаты исследования дополняют нормативную базу по соблюдению инфекционного контроля в стационарной системе и будут способствовать соблюдению всех норм по остановке внутрибольничной передаче туберкулеза в стационарных лечебных учреждениях.

Практическая значимость. Проведенное исследование дополняет мероприятия по инфекционному контролю, направленных на недопущение нозокомиального пути передачи туберкулеза в стационарных лечебных учреждениях. Материалы исследования могут быть применены при обучении и повышении квалификации медицинских работников.

Внедрение научных результатов. Результаты исследований служат основой для регулирования, поддержания и усиления мер инфекционного контроля в больничном секторе.

ANNOTATION

Noroc Ecaterina

“Evaluation and prioritization of risk factors in transmission of drug-resistant strains to in-patients TB care”

Thesis of doctor in medicine, Chisinau, 2024

Structure of the thesis: introduction, five chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 241 titles, 17 appendices, 122 pages of basic text, 37 figures, 15 tables. The obtained results are published in 15 scientific papers.

Key words: tuberculosis, multidrug resistance, nosocomial transmission, Ural, Beijing.

Aim of study: evaluation and prioritization of risk factors in the transmission of resistant TB to hospitalized patients in the Republic of Moldova.

Field of study: nosocomial transmission, TB infection control.

Study objectives: documentation and evaluation of the phenomenon of nosocomial transmission of tuberculosis among patients hospitalized for specific treatment in the specialized hospital; Identification of gene mutations conferring resistance to anti-tuberculosis drugs in multidrug-resistant *Mtbc* strains and evaluation of the determinants responsible for treatment failure; Phylogenetic analysis and identification of the main clusters responsible for nosocomial transmission by applying the methods of integral sequencing of the mycobacterial genome and inferring direct transmission events based on genetic distance; Evaluation of knowledge in the field of infectious control in tuberculosis among the medical staff working in the specialized hospital.

The scientific novelty and originality. The scientific novelty emerges from the complexity and uniqueness of the study, but also of the sequencing methods used to identify potential cases of nosocomial tuberculosis.

Results. Whole genome sequencing (WGS) was performed from RR/MDR TB strains to identify putative index patients of hospitalized patients who developed RR/MDR TB during a 2-year follow-up. Detailed molecular surveillance of patients revealed a low rate of nosocomial transmission of RR/MDR TB strains in the national hospital setting. No mutations were identified at the level of genes responsible for resistance to 4 of the new drugs (Clofazimine, Linezolid, Bedaquiline, Delamanid), which gives confidence in the application of new treatment regimens. Treatment failure could be caused by the presence of mutations in the genes responsible for resistance to 2 antimicrobial drugs (Moxifloxacin and Levofloxacin).

The theoretical significance. The results of the study will supplement the normative framework regarding compliance with infection control in the hospital system and will contribute to compliance with all norms regarding stopping the nosocomial transmission of tuberculosis in the hospital system.

The applicative value. The research carried out will complement infection control measures through the prism of complex measures aimed at avoiding nosocomial transmission of tuberculosis in hospital institutions. The research materials can be applied in training and training of medical personnel.

Implementation of scientific results. Research results serve as a basis for regulating, maintaining and strengthening infection control measures in the hospital sector

NOROC ECATERINA

**EVALUAREA ȘI PRIORITIZAREA FACTORILOR DE RISC ÎN
TRANSMITEREA TUBERCULOZEI REZISTENTE LA PACIENȚII
SPITALIZAȚI**

313.02 MICROBIOLOGIE, VIRUSOLOGIE MEDICALĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar:	Formatul hârtiei A4
Hârtie ofset. Tipar digital	Tiraj 50ex.
Coli de tipar: 2,2	Comanda nr. 6

Tipografia Print- Caro, strada Columna 170

Tel.: 022853386, 069124696