

Viso genomo sekoskaitos nauda, tiriant tuberkuliozės mikobakterijų genotipines savybes

WHOLE-GENOME SEQUENCING TO STUDY THE GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS MYCOBACTERIA

ŽYDRŪNĖ TAUTKIENĖ¹, GRETA MUSTEIKIENĖ², SKAIDRIUS MILIAUSKAS²

¹Kauno klinikų filialas Romainių ligoninė, ²LSMU MA Pulmonologijos klinika

Santrauka. Tuberkuliozė (TB) – viena pagrindinių visuomenės sveikatos problemų pasaulyje. Nors veiksmingų gydymo protokolų taikymas leidžia sėkmingai gydyti daugumą TB atvejų, vis dar kyla sunkumų gydant daugeliui vaistų atsparią tuberkuliozę (DVA-TB). DVA-TB gydymas yra sudėtingesnis, brangesnis ir mažiau veiksmingas nei standartinis TB gydymas. Siekiant veiksmingai kovoti su šia grėsme, būtina išsamiai išnagrinėti DVA-TB mikobakterijų genotipines (genų išsidėstymo) ir fenotipines savybes. Viso genomo sekoskaita yra galingas įrankis, leidžiantis analizuoti DVA-TB izoliatų genomus ir nustatyti su vaistų atsparumu susijusius genetinius skirtumus. Ši metodika suteikia galimybę ne tik identifikuoti specifines mutacijas, susijusias su atsparumu vaistams, bet ir atskleisti platesnį genotipinių savybių spektrą, kuris gali būti susijęs su DVA-TB fenotipiniais požymiais. Be to, viso genomo sekoskaita taikyta ne viename moksliniame tyrime, kurių metu pateiktos naudingos išvagos apie DVA-TB genotipinę įvairovę. Be jau žinomų atsparumą lemiančių mutacijų nustatytos ir naujos, iki tol neatrastos mutacijos, galinčios turėti įtakos DVA-TB fenotipui. Taip pat pastebėta, kad skirtingose geografinėse vietose egzistuoja unikalūs DVA-TB genotipų profiliai. Tokia genotipinė TB mikobakterijų įvairovė rodo, jog viso genomo sekoskaita gali būti naudinga ir siekiant geriau suprasti DVA-TB plitimo ir transmisijos savitumus skirtinguose pasaulio regionuose.

Reikšminiai žodžiai: daugeliui vaistų atspari tuberkuliozė, viso genomo sekoskaita, filogenetinės linijos, atsparumas vaistams.
Summary. Tuberculosis (TB) remains one of the world's major public health problems. Although the use of effective treatment protocols allows the successful treatment of most TB cases, challenges remain in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). MDR-TB treatment is more complicated, more expensive and less effective than standard TB treatment. In order to effectively combat this threat, a detailed study of the genotypic (arrangement of genes) and phenotypic characteristics of MDR-TB mycobacteria is necessary. Whole-genome sequencing is a powerful tool to analyze the genomes of MDR-TB isolates and identify genetic differences associated with drug resistance. This methodology provides the opportunity not only to identify specific mutations associated with drug resistance but also to reveal a broader spectrum of genotypic features that may be associated with the phenotypic features of MDR-TB. Several studies using this methodology have yielded useful insights into the genotypic diversity of MDR-TB. In addition to known resistance-determining mutations, new, previously undiscovered mutations that may influence the MDR-TB phenotype have been identified. It has also been observed that unique MDR-TB genotype profiles exist in different geographic locations. Such genotypic diversity of TB mycobacteria shows that whole genome sequencing can be useful for better understanding the spread and transmission of MDR-TB in different regions of the world.

Keywords: multidrug-resistant tuberculosis, whole genome sequencing, phylogenetic lines, drug resistance.

DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.1487>

ĮVADAS

Nors atrandama naujų gydymo schemų bei gerėja diagnostikos rodikliai, tuberkuliozė (TB) vis dar išlieka svarbia visuomenės sveikatos problema visame pasaulyje. Kasmet nustatoma bent 10 mln. ligos atvejų [1], o 2022 m. 450 000 iš jų nustatyta rifampicinui atspari TB (RA-TB) arba daugeliui vaistų atspari TB (DVA-TB) [1]. TB išlieka ir tarp pagrindinių mirties priežasčių nuo infekcinių ligų pasaulyje [1] ir kasmet sukelia apie 1,6 mln. mirčių [1].

Sergančiųjų vaistams atsparia TB, ypač RA-TB ir

DVA-TB, gydymas yra sunki našta sveikatos priežiūros sistemai, nes RA arba DVA-TB gydymo trukmė įprastai yra ilgesnė, o gydymo veiksmingumas mažesnis, palyginti su ne vaistams jautria TB. Be to, skiriami vaistai dažniausiai būna brangesni ir sukelia daugiau nepageidaujamų reakcijų.

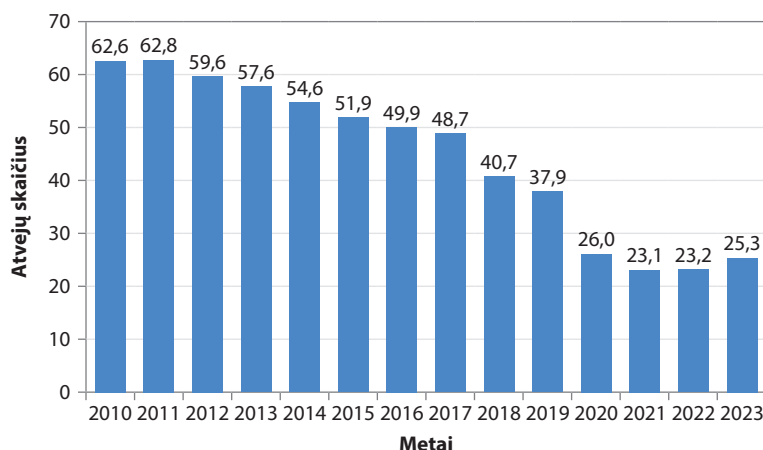
Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras 2022 m. paskelbė, kad Europos Sąjungos ir Europos ekonominės erdvės šalyse 2020 m. iš visų 14 997 TB atvejų užregistruota 4,3 proc. RA-TB ir 3,8 proc. DVA-TB. Tarp Europos šalių didžiausia DVA-TB atvejų dalis priklausė

Moksliniai darbai ir apžvalgos

Estijai (19,4 proc.) ir Lietuvai (16,7 proc.) [2]. Vis tik Lietuvoje per pastarąjį dešimtmetį bendras TB atvejų skaičius sumažėjo (1 pav.) [3]: 2013 m. užregistruoti 1 705 TB atvejai (57,6 atvejai 100 000 gyventojų), iš jų – 256 DVA-TB; 2021 m. – 646 TB atvejai (23,1 atvejis 100 000 gyventojų), iš jų – 105 DVA-TB (18,2 proc.) [3]. DVA-TB atvejų procentinė dalis Lietuvoje didėja žymiau mažėjant bendram TB atvejų skaičiui. Nors sergamumo dinamika yra teigiama, Lietuva vis dar išlieka viena pirmaujančių šalių pagal DVA-TB paplitimą Europos Sąjungoje.

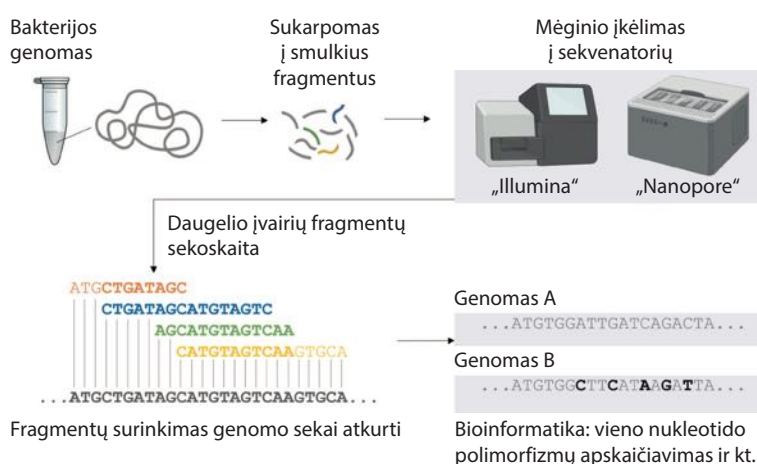
Tuberkuliozės mikobakterijos (TM) jautrumo vaistams tyrimas (JVT) – svarbiausias tyrimas, parenkant gydymo schemą. TM išaugimas pasėlyje vis dar išlieka auksiniu diagnostikos standartu, tačiau fenotipiniai TM JVT yra lėti, ne retai užtrunkantys ir keletą savaičių [4, 5]. Siekiant pagreitinti diagnostiką, pasaulyje vis dažniau naudojami genotipiniai automatizuoti tyrimai, pvz., polimerazės grandininės reakcijos metodu pagrįsti testai, tokie kaip „GeneXpert“, kurie gali nustatyti TM DNR buvimą mėginyje ir atsparumą kai kuriems vaistams tą pačią dieną. Deja, automatizuoti genotipiniai testai turi trūkumų: įprastai jie yra brangesni nei pasėliai, nustato tik TM DNR buvimą mėginyje, todėl gali būti teigiami, jei bakterijos yra negyvos, be to, jais nustatoma tik ribota genetinė informacija, pvz., mutacijos *rpoB* regione, sukeliančios atsparumą rifampicinui [4, 6]. Dėl šių priežasčių automatizuoti genotipiniai testai negali pakeisti fenotipinių tyrimų, kurie iki šiol būtini ne tik platesniam atsparumui vaistams nustatyti, bet ir gydymo veiksmingumui vertinti [7]. Tačiau netolimoje ateityje fenotipinių JVT naudojimą, tikėtina, gali sumažinti TM viso genomo sekoskaita (VGS).

Lietuvos klinikinėje praktikoje TM VGS iki šiol dar nėra taikoma, taip pat stinga žinių ir apie TM genotipinius savitumus. VGS pritaikymas Lietuvoje leistų ne tik nustatyti regionui būdingas genetines linijas, mutacijas, lemiančias atsparumą skiriamiesiems vaistams, bet taip pat turėtų įtakos epidemiologijai, vertinant TB užsikrėtimo ir plitimo kelius, leistų atskirti TB atkryčius nuo pakartotinės infekcijos. Daugėjant informacijos apie skirtingų TM mutacijų įtaką, TM VGS nustatyti duomenys gali lemti gydymo trukmę, vaistų dozę ir kitus svarbius veiksnius, gydant TB sergančius pacientus. Šio straipsnio tikslas – supažindinti skaitytojus su VGS nauda, tiriant *Mycobacterium tuberculosis* genotipines (genų išsidėstymo) savybes.



1 pav. Tuberkuliozės atvejų skaičius 100 000 gyventojų Lietuvoje 2010–2023 m.

Šaltinis: Lietuvos nacionalinis tuberkuliozės registras



2 pav. Viso genomo sekoskaitos etapai

Šaltinis: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bf/WGS_steps_for_analyzing_genomic_linkage.png

VISO GENOMO SEKOSKAITA: PRIVALUMAI IR TRŪKUMAI

Pirmą kartą apie *M. tuberculosis* genomą (H37Rv padermė) paskelbta 1998 m. [8]. Visas TM genomas turi apie 4 mln. bazių porų su beveik 4 000 genų [8]. Apie 50 proc. šių genų kol kas laikomi nežinomais arba jų funkcija ir įtaka atsparumui vaistams yra tik hipotetinė [8, 9].

JVT skirstomi į fenotipinius (pasėliai) ir genotipinius (molekuliniai tyrimai, genų ir genomo sekvenavimas) tyrimus. Genotipinės sąvybės – susiję su genotipu, genų išsidėstymu.

VGS nustatymas parodo visą organizmo deoksiribonukleorūgšties (DNR) struktūrą, leidžiančią geriau suprasti skirtumus tiek tarp rūšių, tiek rūšies viduje, be to, leidžia atskirti organizmus tokiu tikslumu, kurio neleidžia kitos technologijos. VGS susideda iš šių etapų: genomines sukėlėjo DNR išskyrimo, DNR mėginio paruošimo sekoskaitai, sekoskaitos, bioinformacinės duomenų analizės, tyrimo rezultatų protokolo parengimo (2 pav.). Dažniausiai TM genomui sekvenuoti

naudojamos naujos kartos sekoskaitos platformos yra „Illumina“, „Oxford Nanopore“, „Ion Torrent“ ir kt. Taip pat sukurta ne viena speciali TM VGS duomenų bazė: „TB profiler“, „KvarQ“, „TGS-TB“, „CASTB“, „PhyResSe“, „MTBseq“ ir „ReSeqTB-UVP“ [10, 11].

VGS leidžia tirti dažniausias ir aptikti naujas, dar nežinomas, atsparumą vaistams lemiančias mutacijas. Vieno tyrimo metu VGS metodu galima nustatyti atsparumą visiems TB vaistams, jei tik žinoma, kokios mutacijos sukelia atsparumą [9]. Ši metodika ne tik suteikia galimybę identifikuoti specifines mutacijas, susijusias su atsparumu vaistams, bet ir atskleisti platesnį genotipinių savybių spektrą, kuris gali būti susijęs su DVA-TB fenotipiniais požymiais.

Pasaulio sveikatos organizacijos ekspertai parengė TM mutacijų, susijusių su atsparumu vaistams, katalogą, kuris reguliariai atnaujinamas ir gali būti naudojamas kaip šaltinis, interpretuojant nustatytų mutacijų reikšmingumą fenotipui [9, 10]. Vis tik šiame kataloge dar nėra duomenų apie visas galimas mutacijas, o tai gali riboti VGS pritaikymą. Įvairių tyrimų duomenimis, VGS pagrįstų molekulinio atsparumo vaistams testų jautrumas siekia 91,3–97,5 proc., specifiškumas – 93,6–99,0 proc. [10, 11]. Kita vertus, pirazinamido, etambutolio, etionamido ir fluorochinolonų genotipo ir fenotipo koreliacija nedidelė [12, 13]. Reikalingi tolesni tyrimai, kad būtų galima paaiškinti įvairių VGS tyrimų rezultatų neatitikimą.

2023 m. atnaujintose Lietuvos pulmonologų Plaučių tuberkuliozės diagnostikos ir gydymo rekomendacijose nurodoma, kad esant neatitiktims tarp „GeneXpert“ MTB ir RIF tyrimo bei fenotipinio jautrumo prieštuberkulioziniais vaistams tyrimų (pasėlių), turėtų būti atliekama genomo sekoskaita [3].

VGS tampa vis plačiau prieinamu metodu mažėjant jo kainai, atsirandant naujų sekoskaitos platformų. Kai kurios šalys (pvz., Didžioji Britanija) jau dabar atlieka TM VGS visais atvejais, kai pasėliuose išauginamos TM. Populiarėjant VGS nustatymo metodams, tikimasi, kad VGS taps pagrindiniu tyrimu kasdienėje klinikinėje TB priežiūros praktikoje, ypač tuose regionuose, kuriuose fiksuojamas didelis sergamumas TB. Vis tik kol kas TM VGS atlikimas klinikinėse laboratorijose yra sudėtingas procesas. Reikia suplanuoti viešųjų pirkimų procesą, biudžetą, sukurti mėginių siuntimo sistemas, aprašyti standartines veiklos procedūras, užtikrinti tinkamą kokybę, sukurti duomenų valdymo sistemą – neabejotinai reikalinga kompetetinga darbuotojų komanda. Sekoskaitos laboratorijoms įkurti reikia tinkamos infrastruktūros: mėginių paruošimo zonos, molekulinės biologijos aplinkos, palankių aplinkos sąlygų (pvz., kontroliuojamos temperatūros, drėgmės, vibracijos), tinklo ir interneto ryšių. Reikalinga įranga ir reagentai priklauso nuo VGS vykdančios platformos, todėl labai svarbu

užtikrinti, kad kilus nesklaidumams būtų galima lengvai susisiekti su platformos gamintojų atstovais ir gauti greitą techninę pagalbą. Maža to, reikalingas didelis bioinformatikos specialistų indėlis, siekiant išanalizuoti VGS rezultatus [14].

VISO TM GENOMO SEKOSKAITOS PRITAIKYMAS, NUSTATANT ATSPARUMĄ VAISTAMS SUKELIANČIAS MUTACIJAS

Nustačius tikslų ryšį tarp atsparumą vaistams sukeliančių mutacijų ir kiekybinio fenotipinio jautrumo vaistams tyrimo, padidėtų VGS vertė prognozuojant vaistų nuo TB atsparumą [13, 14]. Fenotipinis atsparumo nustatymas išlieka auksiniu tyrimų standartu, genotipinio atsparumo duomenų (šiuo atveju VGS) rezultatai lyginami su fenotipiniais duomenimis. Gauti rezultatai gali skirtis dėl to, kad kai kuriais atvejais genotipiniais metodais nustatomos mutacijos gali būti „tylios“, sukeltos kelių genų tarpusavio sąveikos arba nepakankamai aiškaus mechanizmo. Pastaruoju metu mokslininkai dažnai atkreipia dėmesį į VGS ir vaistų minimalaus slopinančio kiekio (MIK) sąsajas [15, 16].

Daugeliui VGS duomenų rinkinių šiuo metu stinga atitinkamų kiekybinių fenotipinių duomenų – MIK [16]. Taivano mokslininkai „Illumina“ platformoje VGS metodu tyrė 200 TM izoliatų, kuriems fenotipiniu metodu atlikta JVT 12 vaistų [17]. Palyginus MIK su numatomais atsparumo vaistams profiliais, nustatytais VGS, paaiškėjo, kad VGS padeda numatyti atsparumo izoniazidui, rifampicinui, streptomycinui, fluorochinolonams ir aminoglikozidams lygį. Vienos nustatytos mutacijos gali būti nesusijusios su atsparumu vaistams, o kitos gali keisti MIK jas neįsijončioms TM padermėms. VGS duomenys atitiko fenotipinius JVT rezultatus [17]: atsparumo izoniazidui lygis – 95 proc., rifampicinui – 98 proc., pirazinamidui – 98,5 proc. ir fluorochinolonams – 99,5 proc. Antros eilės injekcinių vaistų atsparumo atitikimo lygis siekė 99,5 proc.: etambutoliui – 87,5 proc., streptomycinui – 88 proc. ir etionamidui – 84 proc. Panašus tyrimas atliktas ir Latvijoje, kur tirti DVA-TB izoliatai [18], tačiau dalis rezultatų skyrėsi: fenotipinis ir genotipinis atitikimas streptomycinui, ofloksacinui ir pirazinamidui viršijo 90 proc. (atitinkamai – 95,4 proc., 93,7 proc., 93,7 proc.) (kiti publikuoti tyrimai nurodo vidutinį atitikimą [19–21]), o etionamido, etambutolio, moksifloksacino, amikacino, kanamicino ir kapreomicino fenotipinis ir VGS pagrįstas jautrumo vaistams modeliai koreliavo prastai (nuo 56,4 proc. (etionamido) iki 85,7 proc. (etambutolio)). Pastebėta, kad etionamido atsparumas, nustatytas VGS, buvo dažnesnis, palyginti su fenotipiniu tyrimu, naudojant Löwenstein-Jensen terpę (t. y. 84,1 proc., palyginti su 35,9 proc.) [18]. Faksri ir kt. tyrime nustatyti

Moksliniai darbai ir apžvalgos

vidutiniai atitikimo rodikliai (81,37 proc.): izoliatai buvo fenotipiškai atsparūs „Middlebrook“ 7H10 agaru plokštelėse, bet jautrūs tiriant VGS metodu [8]. Pirazinamido fenotipinio JVT ir VGS rezultatų atitikimas ir kitų autorių atliktuose tyrimuose buvo aukštas – siekė 91–93,8 proc. atvejų [18–21]. Kituose tyrimuose nustatyta visiška atitiktis tarp fenotipinių JVT ir VGS rezultatų amikacinui [12, 20]. Vargas ir kt. tyrimas parodė, kad *eis* C-14T promotoriaus mutacija negali užtikrinti atsparumo amikacinui ir kanamicinui, jei jis sutampa su funkcijos praradimą koduojančiomis mutacijomis *eis* srityje [23]. Vis tik, ar sąveika su skirtingomis *eis* promotoriaus mutacijomis gali nulemti jautrumą vaistams, dar reikia išsifruoti. Ne viename tyrimo nurodomas 93,7 proc. atitikimas fenotipinio ir VGS genotipinio JVT ofloksacinui [10, 12, 13]. Vyrauja nuomonė, kad visi aptikti *gyrA* ir *gyrB* genai suteikia TM kryžminį atsparumą fluorochinolonams, pastebėtas mažesnis fenotipinių ir genotipinių duomenų atitikimas moksisfloksacinui [20–24]. Kituose panašiuose tyrimuose taip pat įrodytas žymus atitikimas tarp abiejų testavimo metodų izoniazido ir rifampicino atžvilgiu [20, 21–25].

Nors stebimi neatitikimai tarp genetinio ir fenotipinio jautrumo, neabejojama, kad VGS turi puikų atsparumo vaistams prognozavimo potencialą [7, 25–35].

VISO TM GENOMO SEKOSKAITOS TAIKYMAS EPIDEMIOLOGIJOJE

Per pastaruosius du dešimtmečius dėtos didelės pastangos, siekiant suprasti TM padermių genetinę įvairovę ir jų geografinį paplitimą. TM kompleksas yra filogeografiškai pasiskirstęs tam tikromis linijomis, kurios gali lemti atsparumo vaistams atsiradimą, užkrečiamumą, patogeniškumą, ligos vietą ir sunkumą [29, 30]. Tvirtas TM padermių klasifikavimas į evoliuciškai reikšmingas sublinijas yra svarbus tiek taksonominiais tikslais, tiek dėl to, kad porūšiai gali skirtis virulentiškumu arba atsparumu antibiotikams.

1997 m. pirmą kartą TM suskirstytos į tris pagrindines genetines grupes pagal du neutralius vieno nukleotido variantus atsparumo antibiotikams genuose *katG* ir *gyrA*. Šiuo metu pripažįstamos devynios TM linijos (L1–9), iš jų dvi linijos (L2, L4) gerai žinomos taksonominėje ir filogeografinėje evoliucijoje, o kitos dvi (L1 ir L3) – pakankamai neištirtos. Pagrindinės linijos turi 53 porūšius: 7 L1, 6 L2, 4 L3 ir 36 L4. Genetinių linijų L1 ir L3 populiacijos struktūra yra mažiau suprantama, nes šios linijos labiausiai paplitusios šalyse, kuriose TM genomo sekos nustatymas nebuvo plačiai taikomas.

Didėjančios VGS atlikimo galimybės didelio TB sergamumo šalyse leidžia vertinti L1 ir L3 paplitimą įvairiose pasaulio vietose. Manoma, kad šeimininko

ir patogeno evoliucija, naujesni su šeimininku susiję įvykiai skatina TM genetinę įvairovę, o tai svarbu visuomenės sveikatai, nes atrandami TM porūšių perdavimo keliai, priklausomai nuo šeimininko specifinių savybių. Vietname paplitusių TM porūšių L2 sublinija (2.2.1) buvo labiau užkrečiama, palyginti su kitais L2 ir L4 arba L1 porūšiais [29]. Kitame tyrimo [30] pranešta apie mažesnę L3 plitimą, palyginti su kitomis pagrindinėmis TM linijomis Monrealyje, Kanadoje. Galiausiai, L5 ir L6 (taip pat žinomų kaip *M. africanum*), L7, L8 ir net kai kurių L4 porūšių filogeografija parodė, kad šios grupės yra labiau geografiškai apribotos nei L2 ir kiti L4 porūšiai. Keiliama hipotezė, kad šie tik tam tikroje geografinėje vietoje esantys porūšiai pirmiausia užkrečia tik tam tikros populiacijos žmones [30]. Matuš Dohál ir kt. 2022 m. publikavo straipsnį apie Čekijoje pirmą kartą atliktą VGS pagrįstą DVA-TB padermių analizę, siekiant tirti filogenetinių linijų įvairovę, atsparumo vaistams mechanizmus ir vykstančius transmisijos kelius šalyje [31]. Filogenetinė VGS duomenų analizė parodė, kad dauguma DVA-TB TM zoliatų buvo 2.2.1 Pekino linijos, o likusios padermės priklausė Europos ir Amerikos linijai. Pekino kilmės padermės yra paplitusios visame pasaulyje ir susijusios su DVA-TB plitimu Eurazijoje [31–33]. Pekino linija labiausiai paplitusi Azijoje ir Europoje, ypač Rytų Europos šalyse, įskaitant Čekiją, Moldovą, Rusiją ir Ukrainą [36–38]. Šie duomenys rodo, kad Pekino padermės – pagrindiniai DVA-TB nešiotojai Rytų Europoje ir Centrinėje Azijoje. Pastarieji gali lemti keletą rimtų protrūkių artimose geografinėse vietovėse [33–36] ir leidžia prognozuoti DVA-TB plitimą Europoje dėl suintensyvėjusios gyventojų migracijos.

VGS visuomenės sveikatos srityje taip pat gali būti pritaikomas vertinant infekcijos šaltinius, perdavimo kelią, skiriant atkryčius nuo pakartotinių infekcijų.

APIBENDRINIMAS

Lietuvos klinikinėje praktikoje TM VGS iki šiol dar nėra taikoma, taip pat stinga žinių ir apie TM genetinius savitumus. VGS pritaikymas Lietuvoje leistų ne tik nustatyti regionui būdingas genetines linijas, mutacijas, lemiančias atsparumą skiriamiems vaistams, bet taip pat turėtų įtakos epidemiologijai, vertinant TB užsikrėtimo ir plitimo kelius, leistų atskirti TB atkryčius nuo pakartotinių infekcijų. DVA-TB genetinių požymių tyrimas ateityje galėtų turėti reikšmingos įtakos sergamumo TB mažinimui, sergančiųjų TB gyvenimo kokybės gerinimui, nustatant regionui būdingas TB bakterijų genetines linijas, parenkant gydymo taktiką ir numatant gydymo baigtis Lietuvoje.

Fenotipinių JVT ir VGS duomenų neatitikimas reikalauja tolesnio tyrinėjimo, leidžiančio identifikuoti visas atsparumą lemiančias genų mutacijas, kurios

koreliuotų su moderniais MIK grįžtais fenotipiniais jautrumo vaistams tyrimų rezultatais ir gydymo baigtimis. VGS metodas neabejotinai suteikia didelį potencialą mokslininkams vystyti DVA-TB molekulinę epidemiologiją pasaulyje.

Gauta 2024 08 01

Priimta 2024 08 22

LITERATŪRA

- World Health Organisation.** Global tuberculosis report 2022. Available at: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022> Date last accessed: July 20 2024.
- European Centre for Disease Prevention and Control.** Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2020-2022. Available at: www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TB-Surveillance-report_24March2020.pdf Date last accessed July 20 2024.
- Zablockis R, Danila E, Miliauskas S, Malakauskas K, Davidavičienė E, Vasiliauskaitė L.** Plaučių tuberkuliozės diagnostikos ir gydymo rekomendacijos (Lietuvos pulmonologų sutarimas). Antrasis papildytas leidimas, Vilnius, 2023: 7–9.
- Ko DH, Lee EJ, Lee SK, Kim HS, Shin SY, Hyun J, et al.** Application of next-generation sequencing to detect variants of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: genotype-phenotype correlation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1):2.
- Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ, Clifton DA, Kapatai G, Ip CLC, et al.** Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(10):1193–202.
- Sun L, Zhang L, Wang T, Jiao W, Li Q, Yin Q, et al.** Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* induced by anti-tuberculosis treatment result in metabolism changes and elevation of ethambutol resistance. *Infect Genet Evol.* 2019;72:151–8.
- CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, Allix-Béguec C, Arandjelovic I, Bi L, Beckert P, Bonnet M, et al.** Prediction of susceptibility to First-Line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *N Engl J Med.* 2018;379(15):1403–15.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393(6685):537–44.
- World Health Organization.** Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>. Date last accessed: July 18, 2024.
- Yang T, Gan M, Liu Q, Liang W, Tang Q, Luo G, et al.** SAM-TB: a whole genome sequencing data analysis website for detection of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance and transmission. *Brief Bioinform.* 2022;23(2):bbac030.
- The CRyPTIC Consortium.** Genome-wide association studies of global *Mycobacterium tuberculosis* resistance to 13 antimicrobials in 10,228 genomes identify new resistance mechanisms. *PLoS Biol.* 2022;20(8):e3001755.
- Sun W, Gui X, Wu Z, Zhang Y, Yan L.** Prediction of drug resistance profile of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-MTB) isolates from newly diagnosed case by whole genome sequencing (WGS): a study from a high tuberculosis burden country. *BMC Infect Dis.* 2022;22(1):499.
- Whitfield MG, Engelthaler DM, Allender C, Folkerts M, Heupink TH, Limberis J, et al.** Comparative performance of genomic methods for the detection of pyrazinamide resistance and heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2022;60(1):e0190721.
- Antimycobacterial Susceptibility Testing Group.** Updating the approaches to define susceptibility and resistance to anti-tuberculosis agents: implications for diagnosis and treatment. *Eur Respir J.* 2022;59(4):2200166.
- Nonghanphithak D, Kaewprasert O, Chaiyachat P, Ree-chaipichitkul W, Chaiprasert A, Faksri K.** Whole-genome sequence analysis and comparisons between drug-resistance mutations and minimum inhibitory concentrations of *Mycobacterium tuberculosis* isolates causing M/XDR-TB. *PLoS ONE.* 2020;15:e0244829.
- Xiao YX, Liu KH, Lin WH, Chan TH, Jou R.** Whole-genome sequencing-based analyses of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Taiwan. *Sci Rep.* 2023;13(1):2540.
- Viksna A, Sadovska D, Berge I, Bogdanova I, Vaivode A, Freimane L, et al.** Genotypic and phenotypic comparison of drug resistance profiles of clinical multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates using whole genome sequencing in Latvia. *BMC Infect Dis.* 2023;23(1):638.
- Goig GA, Cancino-Muñoz I, Torres-Puente M, Villamayor LM, Navarro D, Borrás R, et al.** Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical samples for high-resolution genomic epidemiology and drug resistance surveillance: an observational study. *Lancet Microbe.* 2020;1(4):e175–83.
- Yordanova S, Bachiyska E, Tagliani E, Baykova A, Atanasova Y, Spitaleri A, et al.** Whole genome sequencing of bulgarian rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Folia Med (Plovdiv).* 2022;64(4):633–40.
- Liu D, Huang F, Zhang G, He W, Ou X, He P, et al.** Whole-genome sequencing for surveillance of tuberculosis drug resistance and determination of resistance level in China. *Clin Microbiol Infect.* 2022;28(5):731.
- Vargas R Jr, Freschi L, Spitaleri A, Tahseen S, Barilar I, Niemann S, et al.** Role of epistasis in amikacin, kanamycin, bedaquiline, and clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(11):e0116421.
- Goig GA, Torres-Puente M, Mariner-Llicer C, Villamayor LM, Chiner-Oms Á, Gil-Brusola A, et al.** Towards next-generation diagnostics for tuberculosis: identification of novel molecular targets by large-scale comparative genomics. *Bioinformatics.* 2020;36(4):985–9.
- World Health Organisation.** Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs, 2008. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-TB-2008.392> Date last accessed: July 18 2024.
- World Health Organisation.** Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis, 2018. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-TB-2018.5> Date last accessed: July 18 2024.
- Pole I, Trofimova J, Norvaisa I, Supply P, Skenders G, Nodi-eva A, et al.** Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genetic lineages circulating in Riga and Riga region, Latvia, isolated between 2008 and 2012. *Infect Genet Evol.* 2020;78:104126.
- Korhonen V, Kivelä P, Haanperä M, Soini H, Vasankari T.** Multidrug-resistant tuberculosis in Finland: treatment outcome and the role of whole-genome sequencing. *ERJ Open Res.* 2022;8(4):00214–2022.
- Kabahita JM, Kabugo J, Kakooza F, Adam I, Guido O, Byabajungu H, et al.** First report of whole-genome analysis of an extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate with bedaquiline, linezolid and clofazimine resistance from Uganda. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2022;11(1):68.
- Zade A, Shah S, Hirani N, Kondabagil K, Joshi A, Chatterjee A.** Whole-genome sequencing of presumptive MDR-TB isolates from a tertiary healthcare setting in Mumbai. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022;31:256–62.
- Freschi L, Vargas R Jr, Husain A, Kamal SMM, Skrahina A, Tahseen S, et al.** Population structure, biogeography and transmissibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun.* 2021;12(1):6099.
- Senghore M, Diarra B, Gehre F, Otu J, Worwui A, Muhammad AK, et al.** Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages and their role in an emerging threat of multidrug resistant tuberculosis in Bamako, Mali. *Sci Rep.* 2020;10(1):327.
- Dohál M, Dvořáková V, Šperková M, Pinková M, Spitaleri A, Norman A, et al.** Whole genome sequencing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in the Czech Republic, 2005-2020. *Sci Rep.* 2022;12(1):7149.

Moksliniai darbai ir apžvalgos

32. **Rajendran A, Palaniyandi K.** Mutations associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review and update. *Curr Microbiol.* 2022;79(11):348.
33. **Thorpe J, Sawaengdee W, Ward D, Campos M, Wichukchinda N, Chaiyasirinroje B, et al.** Multi-platform whole genome sequencing for tuberculosis clinical and surveillance applications. *Sci Rep.* 2024;14(1):5201.
34. **Faksri K, Kaewprasert O, Ong RT, Suriyaphol P, Prammananan T, Teo YY, et al.** Comparisons of whole-genome sequencing and phenotypic drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* causing MDR-TB and XDR-TB in Thailand. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;54(2):109–16.
35. **Li J, Yang T, Hong C, Yang Z, Wu L, Gao Q, et al.** Whole-genome sequencing for resistance level prediction in multidrug-resistant tuberculosis. *Microbiol Spectr.* 2022;10(3):e0271421.
36. **Liu W, Chen J, Shen Y, Jin J, Wu J, Sun F, et al.** Phenotypic and genotypic characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Hangzhou, China. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(9):1016.