



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Lidia Fiedorowicz

Praca doktorska:

**Znaczenie zmienności genetycznej
i fenotypowej *Mycobacterium
tuberculosis* w procesie transmisji
gruźlicy**

Doctoral thesis:

**The importance of genetic
and phenotypic variance
of *Mycobacterium tuberculosis*
in tuberculosis transmission**

- Promotor/Supervisor
prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Instytut Biologii Medycznej
Polska Akademia Nauk
- Promotor pomocniczy/Assistant Supervisor
dr Alina Minias
Instytut Biologii Medycznej
Polska Akademia Nauk

*Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Jarosławowi Dziadkowi,
za życzliwość, opiekę, nie tylko tę naukową, jak i możliwość dalszego rozwoju,
Pani dr Alinie Minias,
za cenne uwagi,
Pani dr hab. Annie Brzostek,
za wsparcie oraz życzliwość,
Panu dr Jakubowi Pawełczykowi, Pani dr Katarzynie Struś oraz Pani mgr Darii Zygale-Pytłos
za wsparcie naukowe w czasie realizacji projektu,
oraz całemu zespołowi
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
za pomoc przy realizacji niniejszej pracy.*

*Szczególne podziękowania należą się również
Pani prof. dr hab. Ewie Augustynowicz-Kopeć
za możliwość udziału w niniejszym projekcie oraz za pomoc w jego realizacji,
oraz Pani dr Monice Kozińskiej i Pani dr Annie Zabost, zawsze wspierających w realizacji pracy.*

Spis treści

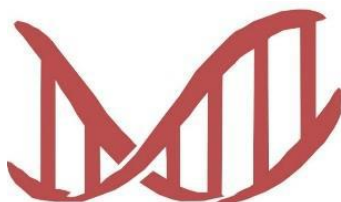
Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej	6
Wykaz skrótów użytych w pracy doktorskiej	7
1. Wstęp	9
1.1. Sytuacja epidemiologiczna gruźlicy na świecie	9
1.1.1. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce	10
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> jako patogen wewnątrzkomórkowy	10
1.3. Leczenie gruźlicy	13
1.3.1. Mechanizmy oporności u prątków gruźlicy	15
1.3.2. Nabycie lekooporności w populacjach prątków gruźlicy	15
1.4. Zmienność genetyczna prątków gruźlicy	16
1.5. Nadzór transmisji gruźlicy na świecie	17
1.5.1. MIRU-VNTR	19
1.5.2. Spoligotyping	19
1.5.3. WGS	20
1.6. Czynniki wpływające na rozprzestrzenianie się gruźlicy	22
1.6.1. Czynniki gospodarza	24
1.6.2. Czynniki środowiskowe	26
1.6.3. Czynniki socjoekonomiczne	27
1.6.4. Czynniki patogenu	28
2. Cele pracy	32
3. Materiały	34
3.1. Szczepy bakteryjne	34
3.2. Linie komórkowe	37
3.3. Wektory plazmidowe	38
3.4. Podłoża mikrobiologiczne	39
3.5. Substancje dodawane do podłoży mikrobiologicznych	42
3.6. Media oraz odczynniki do hodowli komórkowych	42
3.7. Enzymy	43
3.8. Mieszaniny reakcyjne	43
3.9. Stosowane roztwory i bufony	44
3.10. Zestawy komercyjne	44

3.11. Inne odczynniki i materiały	45
3.12. Aparatura	46
4. Metody	47
4.1. Badania przesiewowe i analiza literatury wykorzystane do publikacji artykułu <i>systematic review</i>	47
4.2. Identyfikacja wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych szczepów <i>M. tuberculosis</i> w obrębie kolekcji szczepów IGiChP w Warszawie.....	47
4.2. Hodowle bakteryjne	48
4.3. Hodowle komórkowe	48
4.4. Izolacja DNA plazmidowego z komórek <i>E. coli</i>	49
4.5. Izolacja DNA genomowego z komórek <i>M. tuberculosis</i> metodą lizy termicznej	49
4.6. Hodowla wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i> w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC lub w podłożu 7H9 z cholesterolem w celu uzyskania całkowitego RNA do eksperymentu RNASeq	50
4.7. Izolacja RNA z komórek <i>M. tuberculosis</i> z użyciem Tri-zolu	50
4.8. Pomiar stężenia DNA i RNA	51
4.9. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe genomowego DNA szczepów <i>M. tuberculosis</i>	51
4.10. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe całkowitego RNA	52
4.11. Elektrotransformacja komórek <i>M. tuberculosis</i>	53
4.12. Przygotowanie rekombinowanych szczepów <i>M. tuberculosis</i> o stabilnej ekspresji białka zielonej fluorescencji oraz oporności na kanamycynę.....	53
4.13. Ocena fluorescencji przy pomocy mikroskopii świetlnej	54
4.14. Określenie poziomu względnego oraz bezwzględnego dostosowania ewolucyjnego wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i> w testach kompetycyjnych	54
4.15. Określenie kinetyki wzrostu wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i> w klasycznym inkubatorze hodowlanym	56
4.16. Określenie podstawowego i rozszerzonego profilu lekooporności wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i> przy użyciu testu molekularnego Genotype MTBDRplus ver. 2.0	58
4.17. Określenie profilu odporności na warunki o obniżonej zawartości tlenu wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i>	58
4.18. Różnicowanie linii komórkowej THP-1 do makrofagów	59
4.19. Określenie poziomu pochłaniania wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i> przez makrofagi	60
4.20. Określenie poziomu wewnątrzkomórkowego przeżywania w makrofagach wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i>	63

4.21. Określenie profilu produkcji cytokin prozapalnych przez komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 infekowane wybranymi szczepami <i>M. tuberculosis</i>	63
4.22. Analiza statystyczna.....	64
5. Wyniki.....	65
5.1. Identyfikacja szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych <i>M. tuberculosis</i> z kolekcji szczepów Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie oraz Instytutu Biologii Medycznej, Polskiej Akademii Nauk.....	65
5.2. Badania asocjacyjne wybranych z analizowanej kolekcji genomów szczepów <i>M. tuberculosis</i>	67
5.3. Określenie rozszerzonego profilu lekooporności wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i> .	69
5.4. Analiza krzywej wzrostu 13 par szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych	70
5.5. Określenie profilu odporności na warunki o obniżonej zawartości tlenu wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i>	74
5.6. Określenie poziomu dostosowania ewolucyjnego wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i> w testach kompetycyjnych.	77
5.7. Określenie poziomu wewnątrzkomórkowego pochłaniania i poziomu przeżywania w makrofagach wybranych szczepów <i>M. tuberculosis</i>	81
5.8. Określenie profilu produkcji cytokin prozapalnych przez komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 infekowanych wybranymi szczepami <i>M. tuberculosis</i>	84
5.9. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie całkowitego RNA wybranych szczepów z grup prątków wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych.	89
.....	95
6. Dyskusja.....	97
7. Wnioski.....	108
8. Streszczenie.....	109
9. Abstract.....	112
10. Literatura.....	115

Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Badania zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi



BiolMed

oraz Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie



Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

w Warszawie przy ul. Płockiej 26

i były finansowane z grantu przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 18 pt. „Czynniki *Mycobacterium tuberculosis* wpływające na częstość transmisji gruźlicy” (2019/35/B/NZ7/00942), kierowanego przez Prof. Dr hab. Ewę Augustynowicz-Kopeć.



Wykaz skrótów użytych w pracy doktorskiej

ATCC – Amerykańska Kolekcja Kultur Mikroorganizmów (ang. *American Type Culture Collection*)

cgMLST - genotypowanie wielu *locus* rdzenia genomu (ang. *core genome multilocus sequence typing*)

CRISPR – zgrupowane, regularnie poprzedzielane, krótkie palindromiczne sekwencje powtórzone oraz powiązane z nimi białka (ang. *Clustered Regularly – Interspaced Short Palindromic Repeats and associated proteins*)

DOT – strategia przyjmowania leków przeciwgruźliczych pod nadzorem (ang. *Directly Observed Treatment*)

EMB – etambutol

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HBC – państwa o wysokim obciążeniu gruźlicą, pojęcie ustanowione przez WHO (ang. *high burden country*)

IFN- γ – interferon gamma

IL-1 β – interleukina 1 beta

IL-8 – interleukina 8

IL-12 – interleukina 12

IL-12p40 – interleukina 12p40

IL-18 – interleukina 18

INH – izoniazyd

L1, L2 etc. – linie filogenetyczne *M. tuberculosis* od 1 do 9

NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*)

MDR-TB – gruźlica wielolekooporna (ang. *multi-drug resistant tuberculosis*)

MHC – układ zgodności tkankowej klasy II (ang. *major histocompatibility complex*)

MIRU-VNTR – analiza zmiennej liczby tandemowych powtórzeń mykobakteryjnych (ang. *mycobacterial interspersed repetitive units variable number of tandem repeats*)

MTB – *Mycobacterium tuberculosis*, prątki gruźlicy

MTBC – kompleks prątków gruźlicy (ang. *Mycobacterium tuberculosis complex*)

NK – limfocyty typu *natural killer*, komórki NK (ang. *natural killer cells*)

PAMP – charakterystyczne dla patogenu wzorce molekularne (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PRR – receptory rozpoznające wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors*)

pz – para zasad

RD – regiony zmienne (ang. *regions of difference*)

RFLP – sekwencja insercyjna IS6110 (ang. *restriction fragments length polymorphism*)

RIF – rifampicyna

RR – gruźlica oporna na ryfampicynę (ang. *ryfampicin resistant tuberculosis*)

SNP – polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*)

WGS – wysokoprzepustowe sekwencjonowanie genomowego DNA (ang. *whole genome sequencing*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

XDR-TB – gruźlica o rozszerzonej oporności (ang. *extensively drug-resistant tuberculosis*)

1. Wstęp

1.1. Sytuacja epidemiologiczna gruźlicy na świecie

Gruźlica jest chorobą przenoszoną drogą kropelkową, wywoływaną przez prątki gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB). Gruźlica infekuje głównie płuca, ale może również w postaci gruźlicy pozapłucnej zajmować inne narządy takie jak mózg, nerki czy węzły chłonne (Miggiano, Rizzi, and Ferraris 2020). Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) podaje, że gruźlica jest drugą, zaraz po wirusie SARS-CoV-2, wiodącą chorobą zakaźną powodującą śmierć. WHO szacuje, że w 2022 roku na gruźlicę zachorowało 10,6 miliona osób, a zmarło 1,3 mln. Gruźlica dotyka osób w każdym wieku oraz płci, jednak częściej chorują mężczyźni stanowiąc 55% wszystkich nowych przypadków na świecie (Global tuberculosis report 2022).

Gruźlica występuje na świecie powszechnie, ale nierównomiernie; w niektórych regionach takich jak Azja Południowo-Wschodnia czy Afryka zapada na nią najwięcej osób – regiony te stanowią 87% wszystkich nowych przypadków. Stąd też WHO rozdziela kraje na te o niskiej zapadalności, tj. o wskaźniku zapadalności poniżej 20 przypadków na 100 tys. mieszkańców, i kraje o większej zachorowalności, wymagające specjalnego nadzoru. W tym celu WHO utworzyło listę państw o wysokim obciążeniu (ang. *high burden country*, HBC). Jest to 30 krajów, spośród których 20 włączono ze względu na najwyższą liczbę nowych przypadków oraz pozostałe 10, wykazujące wysoki wskaźnik zachorowalności. Do obszarów o najniższej zapadalności należą m.in. kraje Ameryki Północnej takie jak Stany Zjednoczone i Kanada oraz Europy np. Niemcy, Francja, Wielka Brytania. Najwięcej nowych przypadków gruźlicy w roku 2022 odnotowano w Indiach, Indonezji, Chinach, Filipinach, Pakistanie, Nigerii, Bangladeszu i Republice Demokratycznego Kongo (Global tuberculosis report 2022)

W porównaniu z rokiem 2021, w roku 2022 wzrosła nieznacznie liczba przypadków gruźlicy wielolekoopornej (ang. *multi-drug resistant tuberculosis*, MDR-TB) oraz gruźlicy o rozszerzonej oporności (ang. *extensively drug-resistant tuberculosis*, XDR-TB) (Global tuberculosis report 2022). Ta pierwsza charakteryzuje się opornością na podstawowe leki wykorzystywane do leczenia gruźlicy – ryfampicynę lub ryfampicynę i izoniazyd. Natomiast prątki wywołujące gruźlicę XDR charakteryzują się opornością na ryfampicynę, izoniazyd,

co najmniej jeden lek z grupy fluorochinolonów i bedakilinę oraz/lub linezolid (Viney et al. 2021). W roku 2022 liczba przypadków gruźlicy lekoopornej wynosiła 410 tys. Ze względu na długofalowe efekty pandemii SARS-CoV-2, która rozpoczęła się w roku 2019, dokładne oszacowanie aktualnej zapadalności oraz śmiertelności na gruźlicę jest znacznie utrudnione, a podawane liczby mogą różnić się od sytuacji rzeczywistej (Global tuberculosis report 2022).

1.1.1. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce

Polska według klasyfikacji WHO jest krajem o niskiej zapadalności na gruźlicę. Szacowana zachorowalność w 2022 roku wynosiła 8,9-12 na 100 tys. mieszkańców. Wykryto wtedy 4314 przypadków zachorowań na gruźlicę, z czego 96,2% stanowiła gruźlica płuc. Zgodnie z trendem zaobserwowanym na świecie, również w Polsce zapadalność była większa wśród mężczyzn – stanowili oni 73,8% wszystkich przypadków. Współwystępowanie zakażenia wirusem HIV oraz gruźlicą jest w Polsce zjawiskiem rzadkim. W 2022 roku odnotowano jedynie 13 takich przypadków. W 2022 roku zarejestrowano gruźlicę MDR u 99 osób, w tym 63. cudzoziemców. Ostatnie dane dotyczące śmiertelności pochodzą z roku 2021, kiedy to zarejestrowano w Polsce 440 zgony wywołane przez gruźlicę (Gruźlica i Choroby Układu Oddechowego w Polsce w 2022 r. and Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc 2023)

1.2. *Mycobacterium tuberculosis* jako patogen wewnątrzkomórkowy

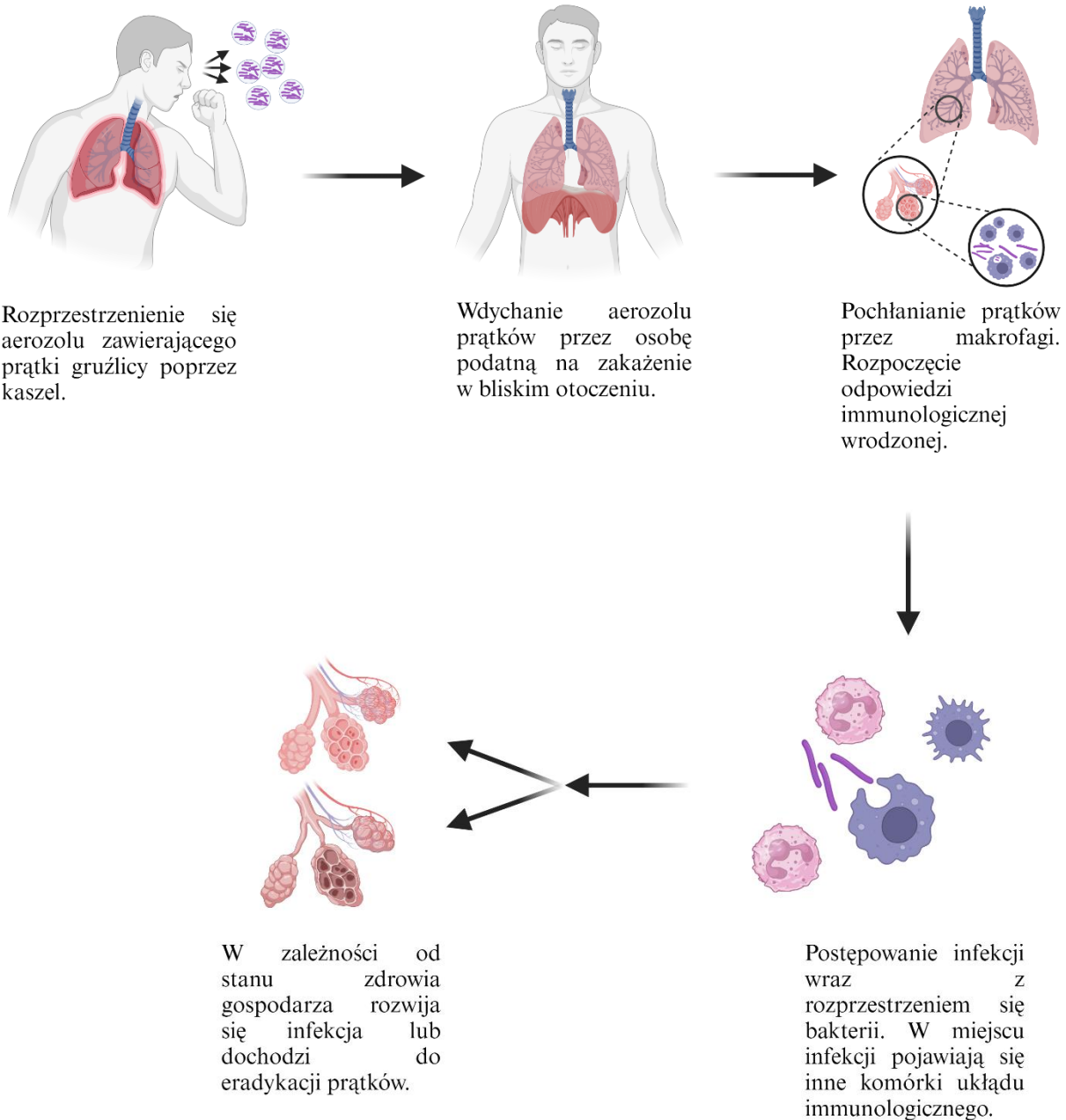
Gruźlica rozprzestrzenia się drogą kropelkową, kiedy osoba chora kaszląc wydalą aerozol zawierający prątki gruźlicy. Jest on następnie wdychany przez kolejną osobę, a prątki przedostają się do jej płuc (Pieters 2008). W pęcherzykach płucnych dochodzi do rozpoznania charakterystycznych dla patogenu wzorców molekularnych (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) poprzez ich interakcję z receptorami rozpoznającymi wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRR), które znajdują się na makrofagach alweolarnych, neutrofilach i komórkach dendrytycznych (Queval, Brosch, and Simeone 2017). Pochłonięcie prątków zapoczątkowuje odpowiedź odpornościową wrodzoną gospodarza, w której najistotniejszą rolę pełnią makrofagi. Są one heterogenną populacją komórek, które różnią się znacznie aktywnością metaboliczną, co może mieć wpływ na to czy choroba zostanie opanowana czy będzie rozwijać

się dalej (Marakalala et al. 2018). Jedną z cytokin, która wydaje się mieć pozytywny wpływ na aktywność makrofagów jest czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (Mishra et al. 2022). Pojawiające się w miejscu wtórnego zakażenia komórki układu immunologicznego gospodarza produkują również szereg innych cytokin prozapalnych, które aktywują oraz przyciągają kolejne komórki. Są to np. interleukina 1 β (IL-1 β) (Silvério et al. 2021), interleukina 8 (IL-8) (Xu et al. 1995).

Jednym z najważniejszych etapów odpowiedzi wrodzonej gospodarza jest pochłonięcie prątków przez komórki gospodarza na drodze fagocytozy. Komórki fagocytarne takie jak makrofagi czy neutrofile pochłaniając bakterie tworzą fagosomy, które dojrzewają i łączą się z lizosomami zawierającymi enzymy trawienne (Zhang et al. 2023). Fagocytoza i wewnątrzkomórkowe zabijanie przez profesjonalne fagocyty jest skuteczna w walce z wieloma patogenami, jednak prątki gruźlicy wykształciły mechanizmy, które pozwalają im często uniknąć strawienia. Po pierwsze, są one w stanie zablokować proces dojrzewania fagosomu oraz jego fuzję z lizosomami, co uniemożliwia ich eradykację (Pieters 2008). W efekcie nie tylko są one zdolne do przeżycia w fagosomie, lecz także do namnażania w nim. Po drugie, prątki mogą również opuszczać fagosomy i przebywać w cytoplazmie, dzięki systemowi ESX-1/T7S. Nie jest jednak poznany mechanizm, który wyjaśniałby dokładnie to zjawisko. Nie wiadomo także, czy prątki przebywają głównie w fagosomach czy raczej w samej cytoplazmie komórek gospodarza (Bussi and Gutierrez 2019).

Na tym etapie odbywa się również degradacja i przetwarzanie antygenów prątków, które następnie wiążą się z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej klasy II (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) i prezentowane są limfocytom T, co zapoczątkowuje odpowiedź odpornościową nabytą. Do aktywacji limfocytów T CD4 niezbędna jest interleukina 12p40 (IL-12p40), która produkowana jest przez komórki dendrytyczne (Khader et al. 2006). Z kolei interleukina 18 (IL-18) i interleukina 12 (IL-12) niezbędne są do aktywacji limfocytów T CD4 i limfocytów cytotoksycznych typu *natural killer* (ang. *natural killer cells*, komórek NK) oraz wytwarzania przez nie interferonu gamma (IFN- γ), który aktywuje bójcze funkcje makrofagów (Zuñiga et al. 2012). Aktywowane limfocyty T wytwarzają cytokiny oraz chemokiny, które przywołują na miejsce infekcji inne komórki układu odpornościowego, neutrofile i komórek

NK (Pagán and Ramakrishnan 2018). Dodatkowo makrofagi pochłaniające prątki również wytwarzają cytokiny np. interleukinę 8 (IL-8), która również przyciąga limfocyty T i neutrofile na miejsce zakażenia (Gerszten et al. 1999). W badaniach Nagabhushanam et al. zauważono, że makrofagi z pochłoniętymi prątkami w środku nie odpowiadają efektywnie na IFN- γ na drodze zależnej lub niezależnej od interleukiny 6 (IL-6), która wydaje się obniżać aktywność makrofagów (Nagabhushanam et al. 2003). Wzrastająca liczba komórek gospodarza starających się powstrzymać infekcję doprowadza do powstania charakterystycznej dla gruźlicy struktury – ziarniniaka (łac. *granuloma*). Ziarniniak składa się z ciasno upakowanych komórek gospodarza oraz prątków gruźlicy. W jego środku znajdują się prątki, dojrzałe makrofagi o specyficznym kształcie porównywanym do komórek nabłonkowych (ang. *epithelioid macrophages*) i makrofagi bogate w lipidy. Od zewnątrz natomiast znajdują się limfocyty T, B, komórki NK, komórki tuczne i neutrofile (Pagán and Ramakrishnan 2018). W środku ziarniniaka może dochodzić do nekrozy tkanek, co powoduje utworzenie martwicy serowatej (łac. *caseum*) (Cronan 2022). W środku ziarniniaka panują warunki ograniczonego dostępu do tlenu oraz substancji odżywczych (Del Portillo et al. 2019). Z tego względu prątki znajdujące się w tej strukturze wchodzą w stan latentny, co znacznie utrudnia terapię gruźlicy (Sarathy and Dartois 2020) (Ryc.1.1.). Prowadzi to do swoistej równowagi między rozprzestrzenianiem się patogenów a dalszym rozwojem reakcji zapalnej i zahamowania dalszego rozwoju choroby, która może zostać w stanie utajonym przez wiele lat i aktywować się w sprzyjających okolicznościach. Jednym z ważnych aspektów reaktywacji choroby jest obniżenie się ilości limfocytów T CD4, które obserwowane jest m.in. u pacjentów chorych na AIDS oraz obniżenie lub zablokowanie funkcji TNF (Ernst 2012). Jednakże nie zawsze zjawiska te występują u pacjentów, a więc za reaktywacją gruźlicy prawdopodobnie stoi szereg nakładających się na siebie czynników. Przebieg oraz rozwój gruźlicy są skomplikowanymi wieloetapowymi procesami, które nie są dokładnie zrozumiane i wymagają dalszych badań szczególnie na ulepszonych modelach zwierzęcych (Ernst 2012).



Ryc. 1.1. Etapy infekcji w przebiegu gruźlicy płucnej.

1.3. Leczenie gruźlicy

Leczenie gruźlicy jest procesem długotrwałym, skomplikowanym i wymagającym jednoczesnej administracji kilku leków (Connolly, Edelstein, and Ramakrishnan 2007). Stosowane obecnie leki przeciwgruźlicze charakteryzują się efektywnością na poziomie 95% w warunkach

in vitro, jednak ze względu na czynniki takie jak niepoprawne ich stosowanie czy przerywanie terapii, rzeczywista efektywność leczenia spada do około 70%. WHO rekomenduje strategię przyjmowania leków pod nadzorem, czyli z ang. „*Directly Observed Treatment*” (w skrócie DOT) (Rabahi et al. 2020). Aby zwiększyć efektywność leczenia i ułatwić wybór właściwych leków w odpowiednich kombinacjach dawek, prowadzone są badania kliniczne nadzorowane przez WHO oraz testowane są nowe rozwiązania zaproponowane przez uczenie maszynowe (Larkins-Ford et al. 2022).

Leczenie gruźlicy lekowrażliwej oparte jest o tzw. leki pierwszego rzutu takie jak: ryfamycyny (ryfampicyna, ryfapentyna, ryfabutyna), izonizyd, pirazynamid oraz etambutol. W przypadku leczenia gruźlicy wywołanej prątkami wrażliwymi na antybiotyki, WHO rekomenduje schemat leczenia w postaci 4-miesięcznej kuracji izoniazidem, ryfapentyną, moksifloksacyną oraz pirazynamidem lub 6-miesięcznej kuracji ryfampicyną w przypadku pacjentów bez wcześniejszej styczności z gruźlicą w historii choroby. W przypadku prątków lekoopornych rekomenduje się schematy leczenia zależnie od profilu oporności oraz wywiadu lekarskiego pacjenta. Gruźlica lekooporna wymaga zastosowania dodatkowych leków klasyfikowanych w grupy A-C. W grupie A znajdują się leki wykazujące wysoką skuteczność przeciwko gruźlicy jak fluorochinolony (lewofloksacyna i moksifloksacyna), bedakilina, linezolid; grupę B stanowią: klofazamina, cykloseryna oraz teryzyd; w grupie C są leki, które można zastosować, gdy nie da się wykorzystać leków z poprzednich dwóch grup. Obecne zalecenia opublikowane przez WHO wskazują, aby do leczenia gruźlicy typu RR (wykazującej oporność na ryfampicynę, ang. *ryfamycin resistant tuberculosis*) lub MDR stosować przynajmniej cztery różne leki np. wszystkie leki z grupy A oraz przynajmniej jeden lek grupy B. W przypadku, gdy nakazane jest wyłączenie nawet jednego leku grupy A, włącza się wszystkie leki grupy B. Do leczenia gruźlicy lekoopornej zaleca się kuracje trwające od 15 do 17 miesięcy lub dłużej w zależności od przebiegu infekcji (World Health Organization *Consolidated Guidelines on Tuberculosis*, n.d.). Wyleczalność gruźlicy MDR w roku 2021 szacuje się na około 60%, co jest znaczącą poprawą w porównaniu z poprzednimi latami, gdzie plasowała się ona na poziomie około 50% (Global tuberculosis report 2022). Sukces wyleczalności gruźlicy MDR jest powiązany w dużej mierze z zastosowaniem uczenia maszynowego, które pozwoliło na przetestowanie i wprowadzenie nowego protokołu leczenia gruźlicy MDR, obejmującego bedakilinę, pretomanid oraz linezolid.

1.3.1. Mechanizmy oporności u prątków gruźlicy

Oporność na antybiotyki dzieli się na naturalną oraz nabytą. Oporność naturalna wynika z ogólnych cech, struktur lub mechanizmów, które sprawiają, że używane leki są mniej skuteczne. Oporność nabyta powstaje w wyniku mutacji w genomie. Przykładem cechy wywołującej naturalną niewrażliwość u mykobakterii jest nietypowa w świecie bakterii ściana komórkowa, która składa się z kompleksu peptydoglikanu, arabinogalaktanu oraz kwasów mikołowych (Alderwick et al. 2015). Grubość i hydrofobowy charakter ściany utrudniają dotarcie substancji czynnych do wnętrza komórki. Innym przykładem struktury warunkującej oporność naturalną są pompy wielorakiej oporności (ang. *efflux pumps*), umożliwiające usuwanie leków z komórki bakterii. Oporność nabyta pojawia się głównie poprzez akumulowanie mutacji punktowych, insercji lub delecji w genach lub promotorach genów, będących celami molekularnymi dla leków lub kodujących enzymy aktywujące pro-leki w komórkach prątków.

1.3.2. Nabycie lekooporności w populacjach prątków gruźlicy

Model nabycia lekooporności zakłada, że część populacji prątków gruźlicy posiada istniejące już mutacje w genomie, które pozwalają na ich przeżywalność w obecności leków przeciwgruźliczych. W wyniku presji selekcyjnej wywołanej działaniem leku przeciwgruźliczego prątki te utrwalają się w populacji i z czasem rozprzestrzeniają się (Jones et al. 2022). W organizmie gospodarza populacje prątków są heterogenne, zatem w każdej znajdują się prątki wykazujące się szeregiem drobnych zmian fenotypowych (Dhar, McKinney, and Manina 2016), które przekładają się na istnienie nie tylko prątków wrażliwych czy posiadających mutacje prowadzące do oporności, ale również takich, które charakteryzują się tolerancją na leki (Jones et al. 2022). Ze względu na ich wysoką przeżywalność nazwano je komórkami przetrwałymi (ang. *persistor cells*) (Zhal Y. et al., 2012). Wykazują się one wzmoczoną przeżywalnością w obecności wysokich dawek leków lub przy długotrwałej ekspozycji na nie, co ułatwia ich utrwalanie się w populacji i dalsze rozprzestrzenianie się (Jones et al. 2022).

Antybiotyki wchodzą w interakcje z ważnymi dla przeżycia komórki strukturami lub enzymami, np. ryfampicyna wiąże się do podjednostki β polimerazy RNA, hamując syntezę mRNA, a izoniazyd hamuje syntezę ściany komórkowej. Ponieważ antybiotyki atakują białka metabolizmu podstawowego uważano, że mutacje prowadzące do powstawania lekooporności,

będą jednocześnie negatywnie wpływały na przeżywalność, a co za tym idzie również na rozprzestrzenianie się takich szczepów w populacji. Zjawisko to nazwano względnym poziomem dostosowania – z ang. *relative fitness cost*, a więc zdolności do namnażania się i dalszego rozprzestrzeniania się względem szczepów wrażliwych na antybiotyki (Knight et al. 2018). Jednakże badania na populacji szczepów holenderskich wykazały, że szczepy posiadające mutację Ser315Thr w białku KatG, odpowiadającą za powstawanie oporności na izoniazyd, rozprzestrzeniają się w stopniu podobnym co szczepy wrażliwe (van Soolingen et al. 2000). Stąd też uznano, że musi istnieć czynnik, który pomaga przywrócić całkowitą lub częściową przeżywalność, za który uznano mutacje kompensacyjne. Mutacje takie mogą znajdować się w celach molekularnych dla antybiotyków lub enzymach spełniających podobne funkcje np. w szczepach opornych na izoniazyd zauważono mutacje w regionie promotorowym genu *ahpC*, powodujące jego nadekspresję. Białko będące produktem ekspresji tego genu spełnia w komórce zasadniczo te same funkcje co białko KatG (Alame Emame et al. 2021). Wpływ mutacji kompensacyjnych na rozprzestrzenianie się prątków zdaje się potwierdzać fakt, że w niektórych regionach szczepy MDR są ze sobą ściśle spokrewnione (Casali et al. 2014).

Z drugiej strony, niektóre grupy badawcze pracujące nad transmisyjnością gruźlicy pokazują, że większość przypadków gruźlicy MDR pochodzi z rozprzestrzeniania się już „istniejących” w populacji szczepów opornych a nie z nabywania nowych mutacji prowadzących do lekooporności (Kendall et al. 2015; Lin et al. 2011). Te dwie teorie mają poważne konsekwencje dla zdrowia publicznego, ponieważ zakładają odmienne modele kontroli rozprzestrzeniania się gruźlicy – zwiększenie efektywności leczenia gruźlicy wrażliwej na antybiotyki bądź wzmożenie wysiłków diagnostycznych w celu ograniczenia transmisyjności gruźlicy MDR.

1.4. Zmienność genetyczna prątków gruźlicy

Mycobacterium tuberculosis należą do kompleksu prątków gruźlicy (ang. *Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC) razem z dziewięcioma innymi gatunkami: *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium canettii* oraz *Mycobacterium mungi* (Huard et al. 2006). Różnią się one preferowanymi gospodarzami, regionami zmiennymi (ang. *regions of difference*, RDs) oraz polimorfizmami pojedynczego

nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Znaczne podobieństwo genomów oraz sekwencji 16S rRNA sprawia, że bakterie MTBC nie spełniają zasadniczo definicji osobnych gatunków, stąd też niektórzy badacze postulują złączenie ich do jednego gatunku (Riojas et al. 2018; Smith et al. 2006).

Ze względu na niską zmienność genetyczną oraz brak obserwowalnej wymiany materiału genetycznego, *M. tuberculosis* uznaje się za bakterie monomorficzne; nazywane również bakteriami klonalnymi (Achtman 2008). Prątek gruźlicy nie nosi plazmidów, a więc nie występuje tu zjawisko lekooporności kodowanej w genach znajdujących się na plazmidach (Derbyshire and Gray 2014). Dlatego też u prątków gruźlicy większą uwagę zwraca się na mutacje warunkujące lekooporność powstające *de novo* i szybkość z jaką one powstają. Gatunki kompleksu MTBC różnią się między sobą o maksymalnie 2400 SNP (Gagneux and Stritt 2022). Częstość mutacji (ang. *mutation rate*) określa się jako 0,3 – 0,5 mutacji w genomie na rok (Ford et al. 2013). Mimo niskiej zmienności genetycznej, zarówno gatunki kompleksu MTBC, jak i same *M. tuberculosis sensu stricto* różnią się względem siebie fenotypowo (Chiner-Oms et al. 2022), a także przejawiają różnice w zdolności do rozprzestrzeniania się, przebiegu wywoływanej przez nie choroby oraz nabywaniu lekooporności (McEvoy et al. 2007). Obecnie prątki gruźlicy podzielono na dziewięć linii filogenetycznych (L1 – L9) pod względem różnic w RD oraz SNP (Bespiatykh et al. 2021). Linie L2, L3 oraz L4 uznawane są za linie „młodsze”, które na drodze ewolucji utraciły fragment genomu o długości 2153 par zasad (pz), nazywany specyficznym dla MTB regionem usunięcia 1 (ang. *MTB-specific deletion 1 region*, TbD1) (Bottai et al. 2020). Najbardziej różnorodne oraz najlepiej scharakteryzowane są linie L2 oraz L4.

1.5. Nadzór transmisji gruźlicy na świecie

Podstawą nadzoru gruźlicy jest rejestracja wszystkich przypadków gruźlicy oraz zbieranie informacji takich jak: wynik badania bakteriologicznego, miejsca rozwoju infekcji oraz historii choroby. Istotne są dane czy jest to nowy przypadek, czy reinfekcja, jaki jest status infekcji HIV, lekooporności, a także o zastosowanym sposobie i skuteczności leczenia. Badania katalogowane są przez specjalne krajowe struktury organizacyjne i przekazywane do WHO, która to organizacja corocznie, od 1997 roku publikuje je w „*Global TB Report*”. Raportowanie następuje w oparciu

o cele założone w „*End TB Strategy*”, będącej ogólnościową strategią mającą na celu eradykację gruźlicy (Githui et al. 2000). Aby tego dokonać niezbędne jest dokładne poznanie mechanizmów rozprzestrzeniania się gruźlicy. Zadanie to ułatwiają techniki typowania genetycznego (genotypowania) prątków, które na podstawie profilowania DNA (ang. *DNA fingerprinting*) pozwalają na zbieranie informacji o pokrewieństwie izolatów. Analiza genetyczna izolatów ułatwia śledzenie szczepów, w tym szczepów szybko rozprzestrzeniających się lub lekoopornych. Szczepy o identycznych lub wysoce zbliżonych profilach określa się jako klastry (Van Soolingen 2001).

Ze względu na niską zmienność genetyczną prątków gruźlicy do ich genotypowania nie stosuje się technik molekularnych, takich jak np. *Multilocus Sequence Typing* (MLST), które z sukcesem używane są dla wielu innych gatunków bakterii. Historycznym przełomem w genotypowaniu epidemiologicznym prątków było odkrycie w ich genomach elementów powtarzających się (van Embden et al. 1993). Pozwoliło to na opracowanie metody opartej o analizę liczby kopii oraz rozmieszczenia w genomie sekwencji insercyjnej IS6110 (ang. *restriction fragments length polymorphism*, RFLP), która szybko stała się złotym standardem genotypowania prątków na świecie. Sekwencję IS6110 opisano w 1990 roku jako sekwencję insercyjną o wielkości 1361 pz, specyficzną dla MTBC (Thierry et al., 1990, McAdam et al., 1990). Niestety w metodzie tej wynik hybrydyzacji typu Southern blot powstający na kliszy RTG bywa trudny do odczytu i standaryzacji (Ansarin et al. 2020). Z tego względu opracowano wygodniejsze w użyciu metody typowania prątków oparte o reakcję PCR np. analizę zmiennej liczby tandemowych powtórzeń mykobakteryjnych (ang. *mycobacterial interspersed repetitive units variable number of tandem repeats*, MIRU-VNTR) oraz spoligotyping (ang. *spacer oligonucleotide typing*). Jedną z wad obu tych metod jest występowanie zjawiska homoplazji tj. podobieństwa wśród szczepów, które nie są rzeczywiście ze sobą spokrewnione, co może utrudniać prawidłowy nadzór epidemiologiczny. Dodatkowo metody te charakteryzują się niższą siłą rozdzielczą (Reyes, Chan, and Tanaka 2012). Wraz z postępem biologii molekularnej do genotypowania zaczęto wykorzystywać bardziej zaawansowane techniki, przede wszystkim wysokoprzepustowego sekwencjonowania genomowego DNA (ang. *whole genome sequencing*, WGS) (Bespiatykh et al. 2021).

1.5.1. MIRU-VNTR

MIRU-VNTR jest metodą wykorzystującą łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) do oceny wielkości oraz liczby powtórzonych sekwencji MIRU-VNTR w genomach prątków (Shi et al. 2018). Sekwencje MIRU-VNTR znajdują się w określonych *loci* i mają zmienną liczbę powtórzeń o długości od 51 do 77 pz (Supply et al. 2000). Sekwencje starterowe zaprojektowane są w taki sposób, że przyłączają się do regionów flankujących każdego *locus*, co pozwala na uzyskanie amplikonów różnej długości w zależności od liczby sekwencji powtórzonych (Supply et al. 2006). Produkty reakcji PCR rozdziela się z użyciem elektroforezy kapilarnej lub żelowej (Supply et al. 2006). Istnieją różne wersje metody MIRU-VNTR w zależności od liczby analizowanych *loci* – 12, 15 oraz najgłębiej różnicujący 24. Wyższa liczba analizowanych *loci* pozwala na zwiększenie wskaźnika dyskryminacji metody, czyli jej zdolności do rozróżniania badanych szczepów (Allix-Béguet, Fauville-Dufaux, and Supply 2008; Christianson et al. 2010). Wynikiem analizy MIRU-VNTR jest prosty kod liczbowy, co ułatwia śledzenie rozprzestrzeniania się szczepów prątków gruźlicy na świecie. Ponadto proces ten nie wymaga użycia skomplikowanych urządzeń ani technik biologii molekularnej. Wadą metody MIRU-VNTR jest konieczność przeprowadzania szeregu reakcji PCR, co sprawia, że metoda jest stosunkowo pracochłonna i czasochłonna. Ponadto, MIRU-VNTR jest wystarczająco dyskryminującą metodą aby wykluczyć transmisję gruźlicy, lecz niewystarczającą by ją potwierdzić (Wyllie et al. 2018).

1.5.2. Spoligotyping

Spoligotyping to technika oparta o reakcję PCR oraz hybrydyzację typu dot-blot, pozwalająca na jednoczesne wykrywanie oraz typowanie prątków na podstawie zaobserwowanego polimorfizmu w obrębie regionu CRISPR-Cas (ang. *Clustered Regularly – Interspaced Short Palindromic Repeats and associated proteins*) (Heyderman et al. 1998). Region CRISPR-Cas składa się z powtarzających się sekwencji (*direct repeat* ang, DR) o długości 36 pz rozdzielanych niepowtarzającymi się unikatowymi sekwencjami rozdzielającymi (ang. *spacers*) o długości od 34 do 41 pz. Szczepy *M. tuberculosis* różnią się obecnością lub brakiem określonych sekwencji DR i rozdzielających (van Embden et al. 2000). W metodzie spoligotyping amplifikuje się sekwencje DNA pomiędzy regionami DR, a produkty reakcji PCR hybrydują się do sond

wykrywających rozdzielające sekwencje unikatowe. Metoda charakteryzuje się dużą prostotą, szybkością wykonania, niskim kosztem oraz wysokim (aczkolwiek niższym niż IS6110 RFLP czy MIRU-VNTR) wskaźnikiem różnicowania. Spoligotyping pozwala na genotypowanie przynależności izolatów do linii, a nawet sublinii filogenetycznych, jednakże technika ta zalecana jest do wstępnego różnicowania izolatów (van Soolingen et al. 1995) ze względu na ograniczenia w możliwości dokładnego określania np. linii filogenetycznych (Comas et al. 2009).

1.5.3. WGS

Początkowo do sekwencjonowania genomów bakteryjnych wykorzystywano metodę opartą o terminację syntezy DNA, opracowaną przez Sanger (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977). Przy zastosowaniu tej techniki, w 1998 roku udało się odczytać kompletny genom wzorcowego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al. 1998). Sekwencjonowanie genomów metodą Sanger'a było bardzo kosztowne i czasochłonne, przez co niemożliwe do wprowadzenia do rutynowych badań diagnostycznych. Zastosowanie genomowego sekwencjonowania w badaniach epidemiologicznych stało się możliwe wraz z rozwojem technik sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS). Metody NGS sprawiły, że WGS stało się dużo bardziej dostępne oraz efektywne poprzez znaczne zwiększenie przepustowości (Kwong et al. 2015).

Metody NGS dzieli się na metody drugiej oraz trzeciej generacji (Slatko, Gardner, and Ausubel 2018). Z tych pierwszych najpopularniejszą technologią jest Illumina, która oparta jest o amplifikację mostkową (ang. *bridge amplification*) i następnie detekcję fluorescencji. W technologiach trzeciej generacji (sekwencjonowanie nanoporowe) pomijany jest początkowy etap syntezy, a sekwencjonowane są pojedyncze cząsteczki kwasów nukleinowych. Przykładem metod trzeciej generacji jest technologia SMRT (ang. *Single Molecule Real Time Sequencing*) opracowana przez firmę Pacific Biosciences, opierająca się o sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym. Kolejną technologią jest sekwencjonowanie na nanoporach (MinION) opracowane przez firmę Oxford Nanopore Technologies wykorzystujące odczyt zmian natężenia prądu, gdy cząsteczka DNA przechodzi przez niewielkie otwory – nanopory (Kwong et al. 2015).

W miarę rozwoju technik masowego sekwencjonowania DNA nastąpiło znaczne obniżenie kosztów uzyskania pełnej sekwencji genomu badanych szczepów, co przyczyniło się do upowszechnienia techniki NGS w mikrobiologii klinicznej. Rozpowszechnienie metod NGS pozwala na gromadzenie oraz analizę dużych baz genomowych szczepów izolowanych od pacjentów z całego świata, dzięki czemu możliwe jest precyzyjne badanie ewolucji prątków. Ponadto wyłonienie specyficznych SNP dla każdej linii filogenetycznej, a nawet sublinii, umożliwia rygorystyczne genotypowanie prątków, pozwalające na precyzyjne nadzorowanie szlaków transmisji poszczególnych szczepów odpowiedzialnych za wybuchy epidemiczne (Freschi et al. 2021; García De Viedma and Pérez-Lago 2018).

Najczęściej stosowanymi metodami nadzoru transmisji z wykorzystaniem WGS są techniki oparte na klastrowaniu poprzez analizę SNP między poszczególnymi parami badanych izolatów lub typowania wielu *locus* rdzenia genomu (ang. *core genome multilocus sequence typing*, cgMLST). W pierwszej z nich do klastrowania szczepów stosowana jest wartość graniczna SNP między szczepami, która wskazuje na to, kiedy mogła zajść transmisja od pacjenta źródłowego do nowego gospodarza. Na podstawie badań przeprowadzonych w krajach o niskiej i wysokiej zapadalności na gruźlicę, za wartość graniczną przyjęto 12 SNP, jako wyznacznik niedawnej transmisji (Meehan et al. 2019; Nikolayevskyy et al. 2019). Niektóre grupy badawcze wskazują na zalety typowania cgMLST, pozwalającego na wysoką porównywalność wyników między laboratoriami ze względu na to, że w metodzie tej klastrowanie odbywa się na podstawie porównania między jedynie 3041 genami z wykorzystaniem specjalnie przygotowanej platformy (Jones et al. 2019; Kohl et al. 2014a).

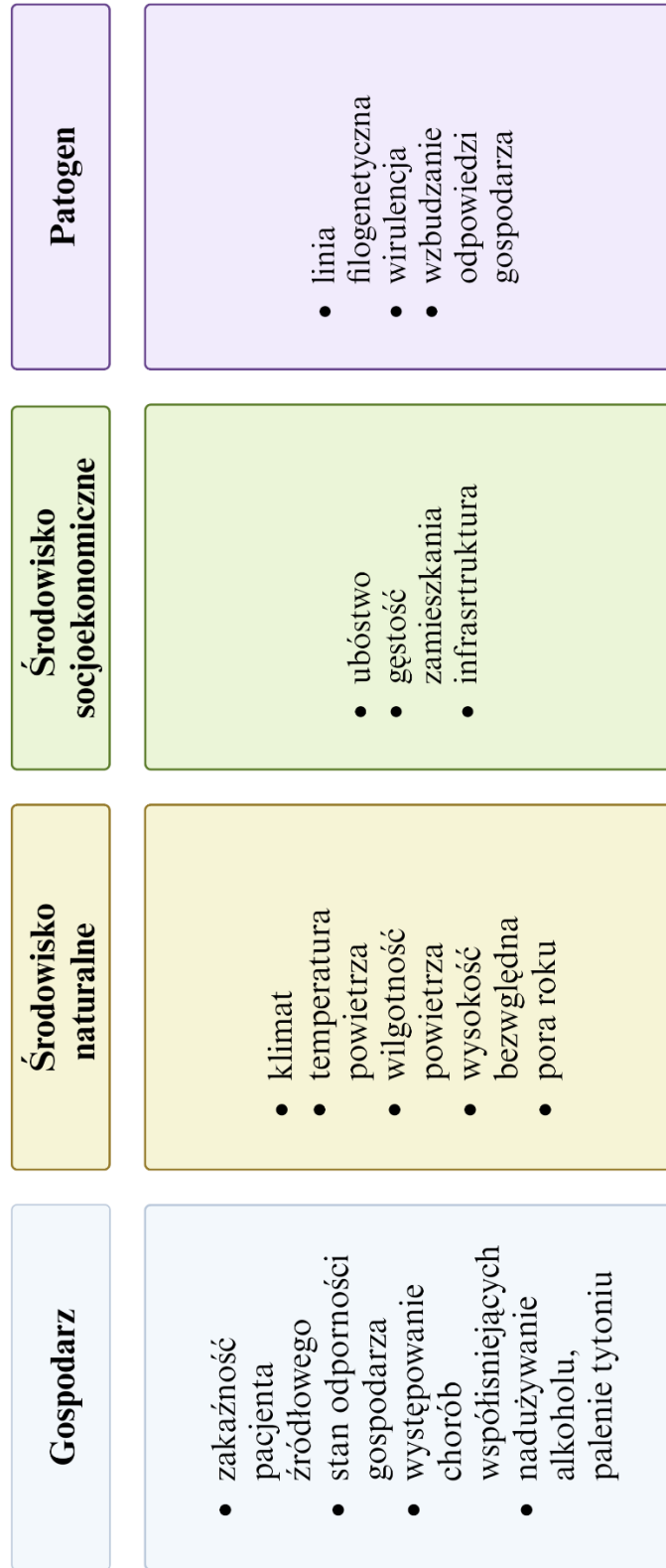
Technika WGS pozwala na bardzo dokładne oznaczanie lekooporności (Coll et al. 2015; CRyPTIC Consortium 2018), aktualnie szacowaną na około 93% zgodności z oznaczeniem metodami fenotypowymi (Heyckendorf et al., 2018). Dodatkowo wysoka rozdzielcza siła WGS pozwoliła na zaobserwowanie zjawiska mikroewolucji jak i heterogenności populacji prątków u pacjenta (Pérez-Lago et al. 2014). W rutynowych badaniach epidemiologicznych WGS generuje koszt, na który składa się zakup odczynników, niezbędnego oprogramowania oraz utrzymanie aparatury. Proponowanymi rozwiązaniami są tutaj np. wdrożenie ogólnokrajowej infrastruktury oraz ograniczenie fenotypowego badania lekooporności dzięki stosowaniu WGS, co pozwoliłoby na duże oszczędności (Cabibbe et al. 2018; He et al. 2020). Ograniczenie stosowania WGS stanowi

trudność związana z koniecznością izolacji DNA. Z uwagi na fakt, że aż 35% chorych na gruźlicę ma ujemny wynik bakterioskopii nie jest możliwe namnożenie biomasy bakteryjnej w celu izolacji DNA wymaganego w technice WGS (Swai, Mugusi, and Mbwambo 2011). Jednakże podejmowane są próby izolacji DNA genomowego bezpośrednio z płwociny pacjenta, z pominięciem etapu hodowli (Doyle et al. 2018). W ostatnim czasie popularność zyskuje wypracowany przez Instytut Pasteura system Deeplex Myc-TB[®], który wykorzystując platformę Illumina opiera się na celowanym sekwencjonowaniu (ang. *targeted sequencing*) 18 regionów związanych z lekoopornością, a także pozwala na szybkie genotypowanie prątków gruźlicy (Feuerriegel et al. 2021).

1.6. Czynniki wpływające na rozprzestrzenianie się gruźlicy

Skomplikowany przebieg gruźlicy u pacjentów oraz długi okres inkubacji z możliwością reaktywacji choroby po wielu latach sprawiają, że na ryzyko zachorowania składa się wiele nakładających się czynników, które trudno jest badać oraz analizować w jednoznaczny sposób. Są to m.in. stan zdrowia gospodarza, właściwości środowiska, w którym się znajduje, jak i charakterystyka samego patogenu. Większość z tych elementów tworzy skomplikowaną sieć powiązań, a zajęcie się każdym z tych problemów i udowodnienie ich znaczenia w skutecznej walce z gruźlicą jest wyzwaniem dla poszczególnych krajów oraz WHO (Narasimhan et al. 2013), (Ryc. 1.2).

Czynniki wpływające na rozprzestrzenianie się gruźlicy



Ryc. 1.2. Czynniki wpływające na rozprzestrzenianie się gruźlicy na świecie.

1.6.1. Czynniki gospodarza

W rozprzestrzenianiu się prątków gruźlicy ważne są zarówno cechy charakteryzujące przyszedłego gospodarza takie jak: stan jego odporności, niedożywienie oraz inne czynniki, które sumarycznie składają się na jego podatność na zakażenie, jak i zdolność pacjenta źródłowego do samego zakażenia (Turner et al. 2017). Nie jest do końca wiadome, w którym momencie przebiegu choroby pacjenci źródłowi stają się zdolni do bycia zakażającymi. Dodatkowymi utrudnieniami w ocenie zakaźności są występowanie różnych typów gruźlicy, wysokiej różnorodności objawów, jak i obecność pacjentów bezobjawowych (Miller et al. 2000). Ponadto znaczny wpływ na prezentowane przez pacjentów objawy ma infekcja wirusem HIV (Corbett et al. 2004; Mtei et al. 2005). Koinfekcja wirusem HIV jest istotnym czynnikiem ryzyka, zwiększająca ryzyko zachorowania na gruźlicę 18-krotnie (*Global tuberculosis report 2020* n.d.). Najwyższy współczynnik zachorowalności na AIDS powiązany z bardzo wysoką zapadalnością na gruźlicę występuje w krajach Afryki Południowej (Corbett et al. 2006). Koinfekcja HIV zwiększa częstość reaktywacji oraz reinfekcji gruźlicy (Bucher et al. 1999), a gruźlica jest najczęstszą przyczyną śmierci osób HIV-pozytywnych (Millet et al. 2013). Inne choroby, takie jak chociażby cukrzyca, także mogą być czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na gruźlicę (Alisjahbana et al. 2006) (Jeon and Murray 2008).

Na zakaźność może mieć wpływ również czas od momentu aktywacji choroby a jej zdiagnozowania oraz sposób wprowadzonego leczenia (Asadi et al. 2022). Wydłużanie się momentu wprowadzenia leczenia od wystąpienia objawów choroby jest znanym czynnikiem ryzyka rozprzestrzeniania się gruźlicy (Mitruka et al. 2014). Obrazowanie bakterioskopowe płwociny jest tradycyjną metodą szacowania zakaźności pacjentów. Zwiększona liczba bakterii w obrazie mikroskopowym płwociny pozytywnie koreluje ze zwiększoną zakaźnością (Zelner et al. 2014). Pacjenci, których bakterioskopia jest ujemna zarażają o około 50% mniej osób niż pacjenci o pozytywnej bakterioskopii (Asadi et al. 2022). Jednakże obecnie badacze próbują również oceniać zakaźność innymi, bardziej bezpośrednimi metodami pomiaru aerozolu, które być może pozwolą na większą dokładność.

Do tej pory uważano, że za powstawanie aerozolu zawierającego prątki odpowiada prawdopodobnie proces chronicznego kaszlu (Turner 2019). Jednak badania wykorzystujące maseczki do poboru aerozolu wskazują, że emisja prątków odbywa się również podczas

normalnego oddechu przepływowego (ang. *tidal breathing*) (Williams et al. 2020). Produkcja aerozolu podczas oddychania jest zmienna wśród pacjentów, co wskazuje na różnice z zakaźności (Wurie et al. 2016). Dodatkowym czynnikiem ryzyka jest żywotność samych bakterii w aerozolu, która nie jest możliwa do oceny metodami mikroskopowymi. Opracowanie metod hodowli prątków bezpośrednio z aerozolu powstającego w trakcie kaszlu pozwoliło na zaobserwowanie, że wysoka liczba bakterii w płwocinie pacjentów oraz jej wygląd wiązały się również z wyższą liczbą bakterii w aerozolu. Dodatkowo pomiary wielkości aerozoli pokazały, że najczęściej hodowalnych prątków uzyskiwano przy cząsteczkach mających 5 µm (Fennelly et al. 2012). Kolejnym ważnym czynnikiem są okoliczności zarażenia się prątkami, takie jak odległość i czas przebywania z chorym. Do zarażenia dochodzi częściej, gdy następuje bliski lub wydłużony kontakt z osobami chorymi np. w domu lub w pracy (Fox et al. 2013).

O przebiegu choroby decyduje wiele czynników związanych z odpornością przyszłego gospodarza. Status immunologiczny gospodarza ma istotny wpływ zarówno na zakaźność, jak i przebieg choroby. Na jego kształtowanie się wpływają zarówno uwarunkowania genetyczne, jak i czynniki środowiskowe (Turner et al. 2017). Do wrodzonych czynników zwiększających podatność na gruźlicę zaliczają się m.in. mutacje w genach takich jak *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1*, *IRF8*, *ISG15*, *NEMO* oraz *CYBB*. Powodują one nieprawidłowe funkcjonowanie szlaków odpornościowych zależnych od limfocytów T CD4, co znacząco osłabia odpowiedź immunologiczną organizmu i zwiększa ryzyko zachorowania na gruźlicę (Bustamante et al. 2014). Na modelu krowim udowodniono, że zwierzęta, u których makrofagi charakteryzowały się zwiększoną aktywnością, były znacznie bardziej odporne na gruźlicę (Wu et al. 2015). Udowodniono również, że liczba limfocytów T CD4 ma związek ze zorganizowaniem oraz liczbą bakterii w ziarniniakach (Di Perri et al. 1996). Zaobserwowano, że niektóre polimorfizmy w genie kodującym IL-1β wśród populacji mieszkańców Gambii powodują wzmożoną podatność na gruźlicę (Awomoyi et al. 2005).

Do obniżenia odporności gospodarza znacznie przyczynia się też niedożywienie, które zwiększa ryzyko zachorowalności 6-10 krotnie, przyczyniając się do zwiększonej umieralności z powodu gruźlicy (Feleke, Feleke, and Biadglegne 2019). Wykazano, że osoby chore na gruźlicę mają znacznie niższy poziom witaminy D w surowicy niż osoby w grupach kontrolnych (Nnoaham and Clarke 2008). Poziom witaminy D jest istotny ze względu na jej udział

w aktywacji białek bakteriobójczych oraz autofagii (Fabri et al. 2011). U pacjentów chorych na gruźlicę obniżony jest również poziom witaminy B12, mimo to nie odnaleziono istotnego wpływu wariantów w genach jej metabolizmu na zachorowalność (Zhang et al. 2022). Do czynników eskalujących ryzyko rozwoju choroby należą również spożywanie alkoholu oraz palenie tytoniu (Schmidt 2008).

1.6.2. Czynniki środowiskowe

Na zakażenie gruźlicą i jej rozwój wpływają czynniki środowiskowe takie jak: temperatura, ekspozycja na światło słoneczne czy wilgotność powietrza; jak i te wynikające z działalności człowieka np. zanieczyszczenia powietrza mające wpływ na ogólny stan zdrowia gospodarza.

Wiele z chorób zakaźnych płuc wykazuje się sezonowością, jednak z powodu złożonej patofizjologii choroby jest ona trudna do zauważenia w przypadku gruźlicy. Systematyczny przegląd zależności pory roku i pojawiania się nowych przypadków gruźlicy w 11 krajach świata wykazał, że zachorowalność na gruźlicę zwiększa się latem i wiosną. Przyczyną tego zjawiska może być zwiększona transmisyjność w chłodnych miesiącach oraz dodatkowe czynniki jak wychłodzenie, niedostateczna ekspozycja na światło słoneczne czy przebywanie w zatłoczonych pomieszczeniach, które przez kilkutygodniowy okres rozwoju choroby mogą skutkować zwiększoną podatnością gospodarza na zachorowanie w tym okresie (Fares 2011). Dokładny wpływ temperatury na rozprzestrzenianie się gruźlicy jest jednak niejednoznaczny. Inne przeprowadzone badania wykazały, że występowanie zarówno ekstremalnie wysokich, jak i niskich temperatur zwiększało liczbę rejestrowanych nowych przypadków gruźlicy (Onozuka and Hagihara 2015). W Chinach natomiast zaobserwowano, że w regionach, w których temperatura otoczenia jest wysoka, zapadalność na gruźlicę zwiększa się (Gelaw et al. 2019).

Wilgotność powietrza jest kolejnym elementem klimatu, którego wysokie wartości wpływają na zwiększone rozprzestrzenianie się gruźlicy (Kuddus, McBryde, and Adegboye 2019:2007–2012; Xu et al. 2020). Udowodniono, że prątki wykazują się znaczną odpornością na wysychanie, dzięki rozwiniętym systemom naprawy DNA (Pitcher et al. 2007). Z kolei niska wysokość bezwzględna sprzyja zwiększonej się liczbie przypadków gruźlicy,

co może być powiązane z mniejszym stopniem zagęszczenia ludności na wyższych wysokościach (Gelaw et al. 2019). Niektóre badania zwracają również uwagę na powiązanie ekspozycji na promieniowanie UV-B a występowaniem gruźlicy. Zaobserwowano, że kraje z wysoką ekspozycją na promieniowanie UV-B notują mniej przypadków gruźlicy. Może to być powiązane ze statusem immunologicznym gospodarza, na który wpływ ma produkcja witaminy D₃ (Boere et al. 2017). Ważnym czynnikiem ryzyka są również zanieczyszczenia powietrza, które powodują wieloczynnikowe uszkodzenia w funkcjonowaniu samych płuc i makrofagów (Lin et al. 2019). Zanieczyszczenia te powstają m.in. podczas palenia tytoniu, spalania paliw kopalnych w pojazdach mechanicznych lub w domu podczas gotowania czy ogrzewania mieszkań (Lin, Ezzati, and Murray 2007).

1.6.3. Czynniki socjoekonomiczne

Czynniki socjoekonomiczne, które mają wpływ na zdrowie człowieka są nazywane społecznymi determinantami zdrowia (ang. *social determinants of health*, SDOH) (Lönnroth et al. 2009). Są to m.in. ubóstwo, niedożywienie, brak dostępu do bieżącej wody, elektryczności czy ogrzewania, przeludnienie w domu, jak i rejonie zamieszkania, niska jakość budownictwa (słaba wentylacja pomieszczeń), brak świadczeń socjalnych, słaba infrastruktura opieki zdrowotnej i brak dostępu do edukacji (Alaridah et al. 2019; Hargreaves et al. 2011). Dodatkowym czynnikiem mogącym wpływać na rozprzestrzenienie się gruźlicy jest również migracja ludności, w tym osób, które nie zostały poprawnie zdiagnozowane a są aktywnie zarażające (Mitruka et al. 2014)

WHO wskazuje na wpływ społecznych determinantów zdrowia na rozprzestrzenianie się gruźlicy na świecie, wśród których wymienia m.in. wyrównanie jakości życia, objęcie ochroną w postaci świadczeń socjalnych osób w grupie zwiększonego ryzyka podatności na gruźlicę, ochronę praw człowieka oraz dostęp do ochrony zdrowia jako jeden z filarów pozwalających na zrealizowanie programu „End TB Strategy” (The end TB strategy 2015). Potrzebę wzięcia pod uwagę społecznych determinantów zdrowia zauważono po ograniczonym sukcesie (a w niektórych regionach jego braku) programów ogólnoswiatowych, skupiających się na walce z gruźlicą jedynie poprzez wczesne wykrywanie nowych przypadków oraz strategię leczenia DOT (Dye et al. 2009; Költringer et al. 2023:2005–2015). Zauważono korelację między niską wartością

wskaźnika rozwoju społecznego (ang. *Human Development Index*, HDI) a zapadalnością (Okhovat-Isfahani et al. 2019) oraz umieralnością na gruźlicę (Rodríguez-Morales and Castañeda-Hernández 2012). Z zapadalnością na gruźlicę koreluje również zależność niskiej wartości produktu krajowego brutto w przeliczeniu na jednego mieszkańca (ang. *per capita Gross Domestic Product*, GDP) (Janssens and Rieder 2008). Podobną zależność między zapadalnością i umieralnością na gruźlicę zauważono w przypadku jakości świadczeń socjalnych (z wyłączeniem opieki zdrowotnej) w przeliczeniu na PKB (Siroka, Lönnroth, and Ponce 2016).

Kolejnym czynnikiem socjoekonomicznym jest postępująca, nie zrównoważona urbanizacja w krajach rozwijających się, co przekłada się również na przeludnienie oraz powstawanie skupisk osób żyjących w ubóstwie. Zapadalność na gruźlicę jest istotnie wyższa w miejscach o wysokim zagęszczeniu ludności (de Abreu e Silva et al. 2016; Clark, Riben, and Nowgesic 2002). W krajach takich jak Brazylia, gdzie w miastach obecne jest poważne rozwarstwienie społeczne, zauważono również pozytywną korelację między mieszkaniem w przeludnionych, ubogich dzielnicach miasta Porto Alegre, a występowaniem zwiększonej liczby przypadków gruźlicy (Acosta and Bassanesi 2014). Podobne rozwarstwienie społeczne istnieje także w Indiach, gdzie z kolei obserwuje się znaczne różnice między zapadalnością na gruźlicę wśród osób zamożnych oraz mniej zamożnych (Pathak, Vasishtha, and Mohanty 2021). Przeludnienie, niedożywienie, niski poziom higieny oraz brak dostępu do opieki medycznej są czynnikami, które mają wpływ na wysoki współczynnik zachorowań także w zakładach karnych (Placeres et al. 2023; Utpatel et al. 2024; Velen and Charalambous 2021).

1.6.4. Czynniki patogenu

Mimo niskiej różnorodności genetycznej prątków gruźlicy, ich właściwości fenotypowe mogą mieć wpływ na transmisję gruźlicy poprzez modulację odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza oraz efektywności leczenia. Wpływ genetycznej oraz fenotypowej różnorodności prątków gruźlicy na ich rozprzestrzenianie jest potwierdzony poprzez ściśle określony zasięg geograficzny poszczególnych linii filogenetycznych. Linie "ewolucyjnie starsze" (L5 – L9) zazwyczaj izolowane są jedynie w poszczególnych regionach Afryki – L5 w Afryce Zachodniej w szczególności w Beninie oraz Ghanie; L6 w Afryce Zachodniej głównie w Sierra Leone, Gambii i Gwinei Bissau; L7 w Etiopii, L8 w rejonie Wielkich Jezior Afrykańskich oraz L9 w Somalii.

Poza Afryką przypadki gruźlicy wywołanej szczepami tych linii filogenetycznych zdarzają się rzadko, głównie wśród imigrantów pochodzących z krajów endemicznych dla tych linii (Silva et al. 2022). Z kolei szczepy linii 2, 3 oraz 4 kojarzone są ze znacznym rozprzestrzenianiem się na całym świecie oraz zwiększoną transmisyjnością (Wiens et al. 2018). Wykazano, że pacjenci źródłowi, od których izolowane są prątki tych linii, zakażają więcej osób (Gagneux et al. 2006).

Tak zróżnicowany zasięg geograficzny sprawił, że szczepy L5 – L9 uznaje się za specjalistów, a pozostałe za generalistów pod względem dostosowania do zakresu gospodarzy. Nie jest jednak dokładnie wiadome, jakie specyficzne adaptacje prątków gruźlicy prowadzą do tak ścisłego doboru gospodarzy i rozmieszczenia filogeograficznego (Stucki et al. 2016). Afryka jest jedynym kontynentem, gdzie izolowane są prątki wszystkich linii filogenetycznych, co może mieć związek z wysoką różnorodnością genetyczną mieszkańców Afryki (Tishkoff et al. 2009) oraz wydaje się potwierdzać teorię wyjścia z Afryki, a także wspólną ewolucję populacji człowieka i prątków (Gagneux 2012). Silną adaptację do gospodarzy, u prątków specjalistów, może również potwierdzać obserwacja, że transmisja szczepów występujących endemicznie jest większa u populacji natywnych niż u imigrantów (Gagneux et al. 2006).

Prątki w obrębie tych samych linii filogenetycznych również mogą się różnić transmisyjnością i być zdolne do ekspansji klonalnej. Wykazano, że konkretne kłady sublinii „młodszej” (nazywanej również linią nowożytną Beijing) linii 2: L2.3.4, L2.3.5 i L2.3.6, charakteryzują się zwiększonym występowaniem na świecie, częstszym klastrowaniem oraz częściej izolowane są z wybuchów epidemicznych na granicach krajów. Szczepy tych kładów pochodzą z Azji Wschodniej i stanowią 83,1% wszystkich szczepów linii Beijing izolowanych na świecie (Zhu et al. 2023). Niektóre badania doszukają się związku np. między białkiem EsxW a rozprzestrzenianiem się sublinii Beijing (Holt et al. 2018). Podobne zjawisko występuje u poszczególnych sublinii linii 4, dla której szczególnym rozprzestrzenieniem charakteryzują się kłady L4.1.2 (Haarlem), L4.3 (LAM), L4.10 (PGG) (Stucki et al. 2016). Badania przeprowadzone przez Cowley et al. wykazały, że szczepy kładu W-Beijing są w stanie rozprzestrzeniać się w populacji znacznie skuteczniej niż inne. Udowodniono to na podstawie wysokiego wzrostu szczepów kładu W-Beijing w Cape Town na przestrzeni lat. Zaobserwowano, że w latach 1930–1965 szczepy te nie były obecne w Cape Town, w latach 1966–1995 stanowiły niewielki odsetek

wszystkich izolatów (2,8%), natomiast w latach 1996–2005 stanowiły już 20% izolatów (Cowley et al. 2008).

Badany jest także związek pomiędzy liniami filogenetycznymi, a wirulencją oraz odpowiedzią układu odpornościowego i obrazem klinicznym choroby. Zadanie to jest jednak utrudnione, ponieważ na przebieg choroby może wpływać bardzo wiele czynników, które ciężko jest kontrolować zbierając dane od pacjentów. Ponadto prątki gruźlicy są patogenami nie posiadającymi typowych czynników wirulencji takich jak np. toksyny bakteryjne (Coscolla and Gagneux 2014), co utrudnia badania w modelach zwierzęcych. Prątki gruźlicy nie wykazują również wysokiej zmienności w genach związanych z czynnikami wirulencji np. odpowiadających za szlaki syntezy ściany komórkowej (Peters et al. 2020). Antygeny rozpoznawane przez limfocyty T CD4⁺ są wysoce konserwatywne, mimo iż odporność na gruźlicę jest w dużym stopniu zależna od limfocytów tego typu (Comas et al. 2010). Sugeruje to, że prątki gruźlicy nie polegają na zmienności antygenowej jak wiele innych patogenów. Poszukuje się korelacji pomiędzy liniami filogenetycznymi a typem gruźlicy i miejscem rozwoju infekcji np. zakażenie L1 zwiększa ryzyko wystąpienia gruźlicy pozapłucnej (Du et al. 2023). Z kolei szczepy sublinii Beijing wydają się być związane z krótszym przebiegiem gruźliczego zapalenia opon mózgowych (Thwaites et al. 2008). W badaniach Portevin i wsp. udowodniono, że szczepy linii 2, 4 oraz 3 wywołują zmniejszoną odpowiedź odpornościową gospodarza w początkowej fazie przebiegu gruźlicy (Portevin et al. 2011). Z kolei badania Ribeiro i wsp. wykazały, że szczepy kladu L2.3 są bardziej wirulentne zarówno na modelu makrofagów jak i na modelu mysim (Ribeiro et al. 2014). Dodatkowo szczepy sublinii Beijing powiązane są również z nieefektywnym leczeniem oraz częstszymi nawrotami choroby, w szczególności wspomniany wcześniej kład L2.3 (Feng et al. 2008). Przeprowadzone badania populacyjne ukazały powiązanie między linią filogenetyczną a poszczególnymi SNP w genomie gospodarza np. SNP w *CD53*, które zwiększały ryzyko zachorowania na gruźlicę u osób w podeszłym wieku, ale jedynie dla linii innych niż Beijing (Omae et al. 2017). Badania nad korelacją genetycznego pochodzenia prątków oraz przebiegu choroby nie są jednak jednoznaczne i wiele z nich prowadzi do przeciwstawnych wniosków (Negrete-Paz, Vázquez-Marrufo, and Vázquez-Garcidueñas 2021).

Podaje się, że rodzaj linii filogenetycznej może także mieć wpływ na lekooporność prątków gruźlicy. Szczepy linii 2 są uznawane za szczepy szybciej nabywające lekooporność ze względu na obecność predestynujących polimorfizmów (Sun et al. 2006; Torres Ortiz et al. 2021) szczególnie w genach odpowiadających za naprawę DNA a więc wyższą częstotliwość pojawiania się mutacji (ang. *mutation rate*). W Uzbekistanie kład 2.3.6 Beijing określony w literaturze jako pochodzący z wybuchu epidemicznego w Azji Centralnej (ang. *Central Asian outbreak, CAO*) charakteryzuje się szybkim rozprzestrzenianiem się i wysoką opornością (MDR lub pre-XDR). Za wysoki sukces rozprzestrzeniania się tego kładu uznawana jest obecność mutacje kompensacyjne (Merker et al. 2018). Innym przykładem jest klastery 14717-15 wyizolowany w Rosji (Mokrousov et al. 2023). Badania izolatów rosyjskich pokazały również, że szczepy Beijing częściej posiadały mutacje odpowiadającą za oporność na izoniazyd (*katG* S315T) oraz na ryfampicynę (*rpoB* S450L) (Casali et al. 2014). Wzrost obecności szczepów Beijing zaobserwowano również w Chinach, gdzie badacze pokazali, że szczepy te posiadają więcej mutacji kompensacyjne (22,1% do 11,1%) niż inne szczepy (Huo et al. 2018). Wysoki procent szczepów Beijing wśród izolatów MDR zaobserwowano również w Korei, gdzie szczepy MDR Beijing częściej posiadały mutację *katG* S315T (65% szczepów Beijing) niż inne linie (Park et al. 2005). Skorelowanie szczepów Beijing z opornością ma również swoje odzwierciedlenie w Polsce, gdzie 61.5% przypadków gruźlicy MDR wywołanych zostało przez sublinię Beijing (Bakuła et al. 2023). Jednakże również inne klady są powiązane z częstszym występowaniem szczepów MDR np. T1 w Mali należący do L4 (Traore et al. 2012). Niektóre grupy badawcze postulują, że lekooporne klady L4 są bardziej ograniczone i nierozprzestrzeniają się tak efektywnie jak klady L2, co pokazano w pracy Merker et al, w której opisano ekspansję kładu W148 od Rosji po Wschodnią i Zachodnią Europę. Sukces tego kładu prawdopodobnie może wynikać z nabywania mutacji kompensacyjnych (Merker et al. 2022).

2. Cele pracy

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zidentyfikowanie różnic genetycznych oraz fenotypowych między szczepami wysokotransmisyjnymi i niskotransmisyjnymi prątka gruźlicy oraz ich wpływu na transmisyjność tychże szczepów.

Cel ten zrealizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

1. Analizę dostępnej literatury w celu analizy, jakie linie filogenetyczne powodują wybuchy epidemiczne gruźlicy na świecie oraz strukturę ich rozprzestrzenienia się geograficznego.
2. Identyfikację wysoko- i niskotransmisyjnych szczepów *M. tuberculosis* w obrębie kolekcji szczepów IGiChP.
3. Badania asocjacyjne genomów *M. tuberculosis* w celu wyłonienia różnic genetycznych między szczepami wysokotransmisyjnymi oraz niskotransmisyjnymi.
4. Badania fenotypowe obejmujące analizę kinetyki wzrostu, wzrostu w warunkach obniżonej ilości tlenu, ocenę lekooporności, określenie poziomu dostosowania ewolucyjnego, ocenę poziomu wewnątrzkomórkowego pochłaniania i zdolności przeżywania w makrofagach wybranych szczepów oraz produkcję cytokin prozapalnych przez komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 infekowane wybranymi szczepami *M. tuberculosis*.

W wielu krajach świata gruźlica jest chorobą powszechną i często niosącą śmierć. Walka z gruźlicą wymaga monitorowania populacji szczepów rozprzestrzeniających się na całym świecie oraz analizy rozpowszechnienia określonych szczepów w populacjach. Obecnie, sekwencjonowanie wysokoprzepustowe genomu umożliwia precyzyjne śledzenie transmisji gruźlicy. W literaturze obecnie brakuje kompleksowego podsumowania charakterystyki wybuchów epidemicznych gruźlicy.

Z tego względu w pracy *systematic review* zatytułowanej ”*An overview of tuberculosis outbreaks reported in the years 2011–2020*” przeanalizowaliśmy badania raportujące ogniska gruźlicy na całym świecie, monitorowane za pomocą WGS izolatów *Mycobacterium tuberculosis*. Przeanalizowaliśmy: 1) mapowanie zgłoszonych wybuchów epidemicznych z lat 2011-2020, 2) oszacowanie ich średniej wielkości, 3) jakie linie filogenetyczne powodują wybuchy epidemiczne, oraz 4) ustalenie wzorców oporności na leki szczepów *M. tuberculosis* biorących udział w wybuchach epidemicznych. Większość danych pochodziła z Europy, Azji i Ameryki Północnej. Ustaliliśmy, że wybuchy epidemiczne gruźlicy były zgłaszane na całym świecie, na wszystkich kontynentach, w krajach zarówno o wysokiej, jak i niskiej zapadalności. Wykryte ogniska epidemiczne zawierały medianę pięciu izolatów *M. tuberculosis*. Większość szczepów powodujących wybuchy epidemiczne należała do L4, rzadziej do L2. Zgłoszone izolaty z ognisk były często odporne na leki.

Wnioskujemy, że potrzeba więcej nadzoru za pomocą WGS nad ogniskami *M. tuberculosis*. Globalnie ustandaryzowane procedury mogą poprawić kontrolę infekcji *M. tuberculosis* (Żukowska et al. 2023).

3. Materiały

3.1. Szczepy bakteryjne

Szczepy bakteryjne wykorzystane do badań w niniejszej pracy zebrano w tabeli 3.1. Do badań wykorzystano 26 klinicznych szczepów *M. tuberculosis*, w tym 22 pochodziły z kolekcji Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie a 4 z kolekcji Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. W charakterystyce szczepów opisano profil lekowrażliwości szczepów z wyróżnieniem izoniazydu (INH), ryfampecyny (RMP) oraz etambutolu (EMB) (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Wykaz szczepów wykorzystywanych do części eksperymentalnej pracy doktorskiej.

Gatunek	Nazwa	Charakterystyka/ Lekowrażliwość (S/R)	Źródło
Szczepy referencyjne			
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	Szczep referencyjny, wirulentny	IBM PAN Łódź
Szczepy kliniczne wysokotransmisyjne			
<i>M. tuberculosis</i>	G01	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	G17	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	G21	INH ^R , RMP ^R , EMB ^R	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	G87	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	G93	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	G101	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	G149	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa

<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	G151	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	G214	INH ^R , RMP ^R , EMB ^R	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	L129/7	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IBM PAN Łódź
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	L139	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IBM PAN Łódź
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	L306/7	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IBM PAN Łódź
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	L321	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IBM PAN Łódź

Szczepy kliniczne niskotransmisyjne

<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	G23	INH ^R , RMP ^R , EMB ^R	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	G191	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	G206	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	384_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	748_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	936_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	1396_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	2904_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa

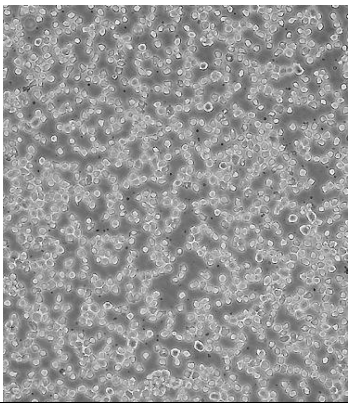
<i>M. tuberculosis</i>	3835_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	4670_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	5764_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	7363_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
<i>M. tuberculosis</i>	8069_NT	INH ^S , RMP ^S , EMB ^S	IGiChP Warszawa
Szczepy zmodyfikowane genetycznie			
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> pMV306KANgfp	Szczep zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	IBM PAN Łódź
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> Δ katG	Szczep "knock-out" z niefunkcjonalnym genem <i>katG</i> , warunkującym oporność na izoniazyd.	IBM PAN Łódź
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbG01</i> pMV306K ANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbG101</i> pMV306 KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbG17</i> pMV306K ANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbG149</i> pMV306KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska

<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbG151</i> pMV306KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbL129/7</i> pMV306KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbL139</i> pMV306KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbL306/7</i> pMV306KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	<i>MtbL321</i> pMV306KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	Praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i>	H37RvpMV306KANgfp	Szczep kliniczny zawierający plazmid pMV306attP _{ercc3_Mtb-gfp} , Km ^R	IBM PAN Łódź

3.2. Linie komórkowe

Wykorzystaną w badaniach linię monocytarno-makrofagowa THP-1, która została udostępniona dzięki życzliwości dr. Izabeli Szulc-Kiełbik oraz prof. dr hab. Magdaleny Klink z pracowni Biologii Molekularnej i Komórkowej IBM PAN w Łodzi, opisano w tabeli 3.2. Linia THP-1 to ludzka linia monocytów, którą zakupiono w Amerykańskiej Kolekcji Kultur Mikroorganizmów (ang. *American Type Culture Collection*, ATCC).

Tabela 3.2. Linie komórkowe wykorzystane w pracy doktorskiej.

<i>Nazwa</i>	<i>Pochodzenie</i>	<i>Źródło</i>	<i>Zdjęcie poglądowe</i>
<i>THP-1</i>	Krew obwodowa; ludzka ostra białaczka monocytarna (<i>ang. acute monocytic leukemia</i>)	ATCC	* 

* Zdjęcie poglądowe komórek linii THP-1 pochodzi ze strony dystrybutora (ATCC; *atcc.org*).

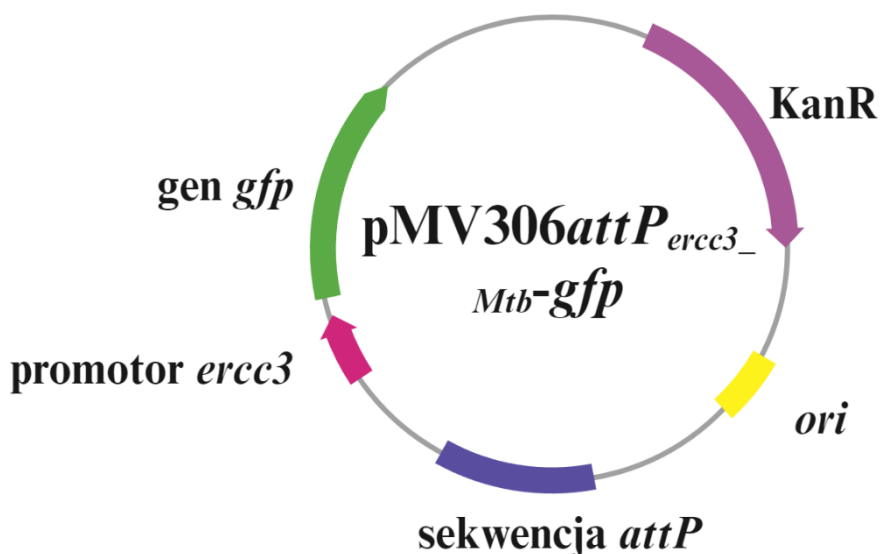
3.3. Wektory plazmidowe

W tabeli 3.3. przedstawiono charakterystykę rekombinowanego plazmidu pMV306*attP_{ercc3-Mtb}-gfp* użytego w pracy doktorskiej. Plazmid ten posiada sekwencję *attP* oraz gen kodujący integrację, co pozwala na włączenie konstruktów w miejsce *attB* genomu *M. tuberculosis* w wyniku miejscowo-specyficznej rekombinacji. Plazmid ten posiada również sekwencję inicjacji replikacji *ori* (*ang. origin*) dla *E. coli*, gen *gfp* kodujący białko zielonej fluorescencji, który znajduje się pod kontrolą promotora genu *ercc3* pochodzącego z genomu prątki gruźlicy oraz gen oporności na kanamycynę, *aph*.

Tabela 3.3. Wektory plazmidowe wykorzystane w pracy doktorskiej.

Nazwa	Opis	Źródło
pMV306attP _{ercc3} Mtb-gfp	Wektor zawierający gen oporności na kanamycynę <i>aph</i> oraz gen reporterowy <i>gfp</i> pod kontrolą promotora genu <i>ercc3</i> .	IBM PAN Łódź

Mapa plazmidu pMV306attP_{ercc3}Mtb-gfp



Ryc. 3.1. Mapa plazmidu pMV306attP_{ercc3}Mtb-gfp

3.4. Podłoża mikrobiologiczne

Do wykonania niniejszej pracy doktorskiej wykorzystywano podłoża stałe oraz płynne. Wszystkie użyte podłoża poza komercyjnymi podłożami do systemu MGIT960 sterylizowano w temperaturze 121°C w czasie 20 minut.

Podłoże Luria-Bertani (LB), pH 7 o składzie:

- Trypton (BioShop) 10 g/L
- Ekstrakt drożdżowy (BioShop) 5 g/L
- Chlorek sodu (BioShop) 5 g/L

Podłoże płynne Middlebrook 7H9 suplementowane OADC, pH 7 o składzie:

- 7H9 Middlebrook Broth (Difco) 4,7 g/L
- Tween 80 (BioShop) 0,05%
- OADC (Becton Dickinson) 10%

Podłoże płynne Middlebrook 7H9 z dodatkiem tyloxapolu, pH 7 o składzie:

- 7H9 Middlebrook Broth (Difco) 4,7 g/L
- Tyloxapol (Sigma-Aldrich) 0,05%
- OADC (Becton Dickinson) 10%

Podłoże płynne BBL™ Middlebrook 7H9 do systemu BACTEC™ MGIT™ 960 o składzie:

- BBL™ Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) 7 ml
- OADC (Becton Dickinson) 10%

Podłoże płynne BBL™ Middlebrook 7H9 z dodatkiem tyloxapol do systemu BACTEC™ MGIT™ 960 o składzie:

- BBL™ Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) 7 ml
- Tyloxapol (Sigma-Aldrich) 0,05%
- OADC (Becton Dickinson) 10%

Podłoże płynne Middlebrook 7H9 z dodatkiem cholesterolu oraz tyloxapolu, pH 7 o składzie:

- 7H9 Middlebrook Broth (Difco) 4,7 g/L
- Tyloxapol (Sigma-Aldrich) 0,01%
- Cholesterol (Sigma-Aldrich) 0,01%

Podłoże stałe Middlebrook 7H10, pH 7 o składzie:

- 7H10 Middlebrook Agar (Difco) 19 g/L
- Glicerol (Sigma-Aldrich) 0,5%
- OADC (Becton Dickinson) 10%

Podłoże stałe Middlebrook 7H10 z dodatkiem kanamycyny, pH 7 o składzie:

- 7H10 Middlebrook Agar (Difco) 19 g/L
- Glicerol (Sigma-Aldrich) 0,5%
- OADC (Becton Dickinson) 10%
- Kanamycyna (BioShop) 25 µg/mL

Podłoże stałe Löwenstein–Jensena, pH 7 o składzie:

- Skrobia ziemniaczana 18,60 g
- L-asparagina 2,23 g
- Jednozasadowy fosforan potasu 1,55 g
- Cytrynian sodu 0,37 g
- Zieleń malachitowa 0,25 g
- Siarczan (VI) magnezu 0,15 g
- Glicerol 7,44 mL
- Jaja (pełne) 620,00 mL
- Woda oczyszczona 373,00 mL

3.5. Substancje dodawane do podłoży mikrobiologicznych

- Antybiotyki

Antybiotyki wykorzystane w badaniach przedstawiono w tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Antybiotyki oraz inne substancje dodawane do podłoży wykorzystywanych w niniejszej pracy doktorskiej.

Nazwa	<i>E. coli</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Kanamycyna (BioShop)	50 µg/mL	25 µg/mL

- Błękit metylenowy

Nazwa	<i>M. tuberculosis</i>
Błękit metylenowy (BioShop)	15 µg/mL

Błękit metylenowy dodawano do podłoża płynnego BBL™ Middlebrook 7H9/Tyloxapol.

3.6. Media oraz odczynniki do hodowli komórkowych

Odczynniki dodawane do podłoży do hodowli komórkowych

- β-merkaptioetanol (Thermo Fischer Scientific)
- RPMI 1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute 1640*, Thermo Fischer Scientific)
- płodowa surowica bydłęca inaktywowana termicznie (FBS, ang. *foetal bovine serum*, Sigma-Aldrich)
- primocyna (InvivoGen)
- mieszanina penicyliny 10000 U/ml i streptomycyny 10000 µg/ml (Thermo Fischer Scientific)

Podłoża do hodowli komórkowej

RPMI 1640 wzbogacone

- RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) 90%
- FBS inaktywowany (Sigma-Aldrich) 10%
- β -merkaptoetanol (Thermo Fischer Scientific) 0,09%
- primocyna (InvivoGen) 0,02%
- mieszanina penicyliny i streptomycyny (Thermo Fischer Scientific) 0,1%

RPMI 1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute 1640*) wzbogacone bez antybiotyków

- RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) 90%
- FBS inaktywowany (Sigma-Aldrich) 10%
- β -merkaptoetanol (Thermo Fischer Scientific) 0,09%

3.7. Enzymy

Enzymy użyte do trawienia DNA

- TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) 5 U/ μ l

Enzymy użyte do trawienia RNA

- RNaza (Sigma-Aldrich) 1 U/ μ l

3.8. Mieszanki reakcyjne

Wytrawianie DNA

RNA	8 μ g
bufor reakcyjny	1 μ l
H ₂ O DEPC do objętości końcowej	25 μ l
DNAza	1 μ l

Mieszanina do syntezy cDNA

RNA	1 µg
heksanukleotyd starterowy	1 µl
bufor reakcyjny	1 µl
H ₂ O DEPC do objętości końcowej	8 µl
2×First-Strand Reaction Mix (Invitrogen)	10 µl
SuperScript™III/RNase OUT™ Enzyme Mix (Invitrogen)	2 µl

3.9. Stosowane roztwory i bufony

- bufor HBSS (ang. *Hanks' Balanced Salt Solution*, Thermo Fischer Scientific)
- bufor PBS o pH 7,0 (ang. *phosphate buffered saline*), bez dodatku jonów wapniowych i magnezowych (BioShop)

3.10. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)
- Zestaw do analizy czystości RNA Agilent RNA 1000 Kit (Agilent)
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji SuperScript III FirstStrand Synthesis SuperMix (Invitrogen)
- Zestaw do usuwania rRNA (rybodeplecji) Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina)
- Zestaw do analizy bibliotek Agilent DNA 1000 Kit (Agilent)
- Zestaw do przygotowywania bibliotek RNA KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms (Illumina)
- Zestaw do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania DNA genomowego TruePrep DNA Library Prep Kit V2 674 for Illumina (Vazyme Biotech)

- Zestaw do analizy jakości bibliotek DNA genomowego Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies)
- Zestaw do analizy lekooporności prątków gruźlicy testami molekularnymi Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH)

3.11. Inne odczynniki i materiały

- 4% roztwór paraformaldehydu (PFA; Fluka Analytical, Szwajcaria) w PBS (% w/o)
- Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich)
- odczynnik Turka o składzie 3,2% kwasu octowego i 0,0025% fioletu krystalicznego (%w/o) w roztworze wodnym z metanolem (Aqua-Med)
- 12-mirystynian-13-octan forbolu (PMA, ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, InvivoGen)
- 0,1% Triton-X 100 (BioShop)
- DNA-zol (Invitrogen)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich)
- TRIzol (Invitrogen)
- Woda DEPC (Ambion)
- GlycoBlue (Invitrogen)
- Izopropanol (MERCK)
- Chloroform (Sigma)
- Glicerol (Sigma)
- Filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 μm (TPP)
- Butelki hodowlane 25cm² do hodowli komórkowych (Nunc)
- Butelki hodowlane 75cm² do hodowli komórkowych (Nunc)
- Butelki hodowlane 25cm² do hodowli mikrobiologicznych (Goodlab)
- Probówki plastikowe do hodowli *M. tuberculosis* w systemie BACTEC™ MGIT™ 960 BBL™ MGIT™ 7 mL *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (Becton Dickinson)
- 24-dółkowe płytki (Nunc)
- Kuwety do elektroporacji (Sigma-Aldrich)

- Probówki z kulkami krzemionkowymi Lysing Matrix (MP Biomedicals)

3.12. Aparatura

- Wirówka do probówek typu Eppendorf MiniSpin® (Eppendorf)
- Wirówka do probówek typu Falcon 5804 (Eppendorf)
- Spektrofotometr DS-11 FX (DeNovix)
- Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)
- System BACTEC™ MGIT™ 960 do prowadzenia hodowli komórkowych *M. tuberculosis* (Becton Dickinson)
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)
- Aparat do elektroporacji (BioRad GenePulser)
- Homogenizator FastPrep-24 MP (Biomedicals)
- Wyrząsarka (Infors Orbitron)
- Cytometr przepływowy Guava EasyCyte 5 (Millipore)
- MAGPIX® System (Illumina)
- Inkubator TwinCubator (Bruker)
- Mikroskop Nikon Eclipse TE 2000-U
- Bio-Rad C1000 Touch Screen PCR Thermal Cycler (BioRad)
- NextSeq 500 (Illumina)
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)

4. Metody

4.1. Badania przesiewowe i analiza literatury wykorzystane do publikacji artykułu *systematic review*

Artykuły uzyskane dzięki wyszukiwaniu haseł „*whole genome sequencing tuberculosis*” oraz „*tuberculosis outbreak*” z baz literaturowych Pubmed oraz Web of Science wgrano do programu COVIDENCE (Covidence), który jest narzędziem do gromadzenia danych. Dane następnie analizowano statystycznie.

4.2. Identyfikacja wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych szczepów *M. tuberculosis* w obrębie kolekcji szczepów IGiChP w Warszawie

Spośród kolekcji IGiChP w Warszawie, na podstawie danych epidemiologicznych oraz wstępnego genotypowania metodą spoligotyping wybrano szczepy potencjalnie wysoko- i niskotransmisyjne. Szczepy wysokotransmisyjne zdefiniowano jako szczepy izolowane wielokrotnie od różnych pacjentów żyjących w obrębie jednego miasta lub nie dalej niż w odległości 50 km od danego miasta. Szczepy te charakteryzował identyczny wzór genetyczny (spoligotyp). Szczepy niskotransmisyjne to takie, które izolowane były na danym obszarze tylko jeden raz o unikalnym wzorze genetycznym – spoligotypie (tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Cechy na podstawie, których przypisywano szczepy w kolekcji IGiChP w Warszawie do poszczególnych kategorii

	Genotypowanie	Rozmieszczenie geograficzne	Dane epidemiologiczne
Kategoria			
Szczepy wysokotransmisyjne	Identyczny spoligotyp	Izolowane wielokrotnie od różnych pacjentów na	Możliwość transmisji

	obszarze w zasięgu 50 km		
Szczepy niskotransmisyjne	Unikalny spoligotyp	Pojedyncze izolaty	Brak potwierdzonej transmisji

4.2. Hodowle bakteryjne

Escherichia coli

Hodowle bakteryjne *E. coli* prowadzono w podłożu płynnym LB w probówkach szklanych w temperaturze 37° do 24 godzin na wytrząsarce o ruchu obrotowym przy prędkości 140 rpm.

Mycobacterium tuberculosis

Hodowle bakteryjne *M. tuberculosis* prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9 z suplementem OADC z odpowiednimi dodatkami w jednorazowych butelkach plastikowych 25cm² w temperaturze 37°C około 2-3 tygodnie bez wytrząsania. Hodowle na podłożu stałym prowadzono na szalkach Petriego z wykorzystaniem podłoża stałego Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC w temperaturze 37°C. Hodowle w systemie BACTEC™ MGIT™ 960 prowadzono w probówkach plastikowych BBL™ BACTEC™ MGIT™ 960 *Mycobacteria Growth Indicator Tube* z dodatkami odpowiednich suplementów w stałych warunkach przez 1-4 tygodnie. W celach uzyskania materiału genetycznego do sekwencjonowania wysokoprzepustowego *M. tuberculosis* hodowano na podłożu stałym Löwenstein–Jensena w formie skosów w temperaturze 37°C przez około 3 tygodnie.

4.3. Hodowle komórkowe

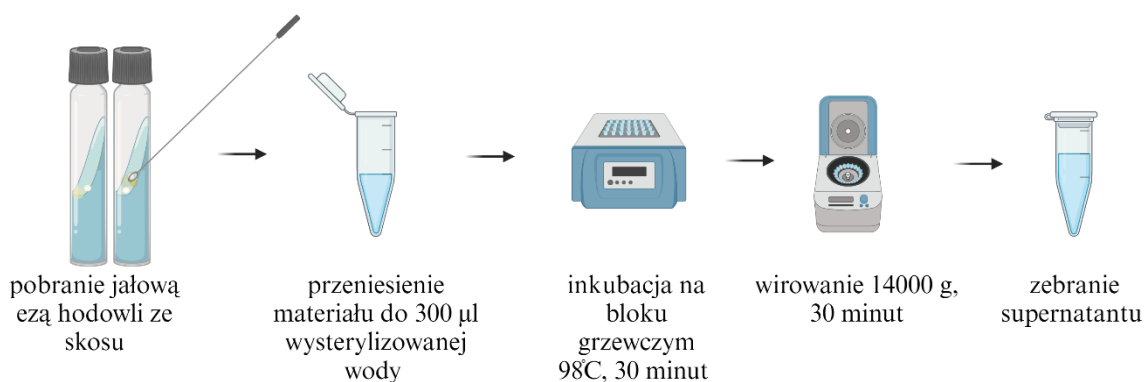
Komórki linii THP-1 były hodowane w podłożu RPMI 1640 wzbogaconym o odpowiednie suplementy na butelkach hodowlanych o powierzchni wzrostu 25 lub 75 cm², w inkubatorze w atmosferze 5% CO₂, wilgotności 90-95%, w temperaturze 37°C. Ocena ilości komórek oraz ich żywotność została oceniona przy użyciu błękitu trypanu w stężeniu 0,4%.

4.4. Izolacja DNA plazmidowego z komórek *E. coli*

Izolacja plazmidowego DNA wykonana została z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System zgodnie instrukcją producenta.

4.5. Izolacja DNA genomowego z komórek *M. tuberculosis* metodą lizy termicznej

Przygotowane wcześniej szczepy *M. tuberculosis* hodowano na podłożu stałym Löwenstein–Jensena w temperaturze 37°C. Gdy szczepy osiągały widoczny wzrost, po około 3 tygodniach hodowli, pobierano materiał jałową eżą i przenoszono do probówek typu Eppendorf zawierających 300 µl jałowej wody. W celu zabicia prątków probówki wstawiano do łaźni wodnej ogrzanej do temperatury 98°C na 30 minut. Następnie próbki wirowano i zbierano 200 µl supernatantu do nowej probówki. Stężenie otrzymanego DNA genomowego mierzono spektrofotometrycznie przy użyciu urządzenia Nanodrop.



Ryc. 4.1. Metodyka uzyskiwania DNA genomowego przy użyciu metody termicznej lizy komórek bakteryjnych.

4.6. Hodowla wybranych szczepów *M. tuberculosis* w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC lub w podłożu 7H9 z cholesterolem w celu uzyskania całkowitego RNA do eksperymentu RNASeq

Hodowle bakteryjne prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9 suplementowanym OADC lub w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem 0,01% cholesterolu oraz 0,01% tyloxapolu do osiągnięcia gęstości optycznej OD=0,6-0,8. Następnie 100 ml hodowli zwirowano w warunkach 3 900 g w temperaturze 37°C. Osady hodowli bakteryjnych przechowywano w temperaturze -80°C.

4.7. Izolacja RNA z komórek *M. tuberculosis* z użyciem Tri-zolu

Izolacja i precypitacja mieszaniny DNA i RNA

Osady komórkowe uzyskane w procedurze 4.6. wyjmowano z zamrożenia i dodawano 300 µl wody DEPC oraz 900 µl odczynnika TRIzol a następnie zawieszano przy pomocy pipety Pasteur'a. Po zawieszeniu osadów przenoszono całość do probówek Lysing Matrix zawierających kulki krzemionkowe i homogenizowano dwukrotnie w aparacie FastPrep®-24 w warunkach dla mykobakterii (dwukrotnie po 45 sekund, 6 m/s). Następnie supernatant przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i inkubowano pozwalając, aby osad opadł na dno. Następnie próbki wirowano w warunkach 12000 g w 4°C i ponownie przenoszono do nowej probówki i inkubowano przez 5 min. Kolejnym etapem było dodanie 250 µl chloroformu i intensywne wytrząsanie (worteks) przez 2 min. Następnie klarowano mieszaninę inkubując 10 min. na lodzie i wirowano 15 minut przy prędkości 12000 g i temperaturze 4°C. Po zwirowaniu fazę górną (wodną) przenoszono do nowej probówki i precypitowano przy użyciu mieszaniny składającej się z 1 objętości izopropanolu, 1/10 objętości 3 M octanu sodu oraz 1 µl odczynnika GlycoBlue. W celu zwiększenia wydajności precypitację prowadzono przez godzinę w -20°C a następnie przez noc w -80°C. Następnie próbki płukano 70% schłodzonym etanolem i wirowano w warunkach 30 minut, 20000 g w temperaturze 4°C. Osad suszono w temperaturze pokojowej do wyschnięcia i zawieszano w 50 µl wody DEPC. Oceniano stężenie uzyskanego preparatu DNA i RNA według procedury opisanej w podrozdziale 4.8. Pomiar stężenia DNA i RNA.

Oczyszczanie mieszaniny DNA i RNA z pozostałości DNA

Aby usunąć resztki DNA z otrzymanych preparatów RNA użyto zestawu TURBO DNA-free™ Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Do trawienia użyto 8 µg mieszaniny. Następnie oceniano integralność uzyskanego RNA za pomocą zestawu Agilent RNA 6000 Nano Kit na urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer zgodnie z zaleceniami producenta. Uzyskany wyizolowany RNA musiał mieć integralność powyżej 7,0, by został użyty do dalszych prac.

Rybodeplecja

Preparaty RNA o akceptowalnej integralności przeniesiono do probówki typu Eppendorf, po czym dodano dwukrotną objętość kulek magnetycznych AMPure XP i wymieszano. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, usunięto supernatant za pomocą separatora magnetycznego, a następnie kulki płukano dwukrotnie 200 µl 70% etanolu i inkubowano 30 sekund. Próbkę została pozostawiona na separatorze magnetycznym aż do wyschnięcia, a następnie dodano 13,5 µl wody DEPC, zawieszono i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej na separatorze magnetycznym. Oczyszczony RNA przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf i poddawano procedurze usuwania rRNA przy użyciu gotowego zestawu Ribo-Zero rRNA Removal Kit, zgodnie z instrukcją producenta.

4.8. Pomiar stężenia DNA i RNA

Pomiarów stężenia DNA i RNA dokonywano z wykorzystaniem spektrofotometru DS-11 FX. Uzyskano wyniki w jednostce ng/µl.

4.9. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe genomowego DNA szczepów

M. tuberculosis

Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania genomowego DNA

Do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania użyto zestawu TruePrep DNA Library Prep Kit V2 674 for Illumina (Vazyme Biotech). Do przygotowania bibliotek wykorzystano 1 ng/ml DNA genomowego wybranych szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych. Następnie

postępowano zgodnie z protokołem załączonym do zestawu przez producenta. Jakość otrzymanych bibliotek oceniano przy pomocy zestawu Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Germany) oraz urządzenia Bioanalyzer tej samej firmy.

Sekwencjonowanie bibliotek DNA genomowego

Przygotowane biblioteki DNA genomowego zostały zsekwencjonowane dzięki uprzejmości Dr Dominika Strapagiela z Pracowni Biobank Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego przy użyciu urządzenia NextSeq 500.

Analiza danych wygenerowanych w wyniku sekwencjonowania genomowego DNA - MTBseq

Analizę obejmującą wywołanie wariantów, klasyfikację linii filogenetycznej oraz identyfikację wariantów związanych z lekoopornością przeprowadzono za pomocą MTBseq v. 1.0.3. Analizę spoligotyping *in silico* przeprowadzono za pomocą SpoTyping.py v. 2.1. Dane dla wariantów wywołanych z próbek DNA genomowego zostały porównane za pomocą testu Fishera pomiędzy grupą szczepów transmisyjnych i nie transmisyjnych.

4.10. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe całkowitego RNA

Przygotowanie bibliotek RNA do sekwencjonowania

Biblioteki do sekwencjonowania przygotowywano z użyciem komercyjnego zestawu KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit zgodnie z poleceniami producenta. W ten sposób uzyskane biblioteki poddawano indeksowaniu. Następnie oceniano jakość uzyskanych bibliotek przy pomocy zestawu Agilent DNA 1000 Kit i urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent).

Sekwencjonowanie bibliotek RNA

Przygotowane biblioteki RNA zostały zsekwencjonowane dzięki uprzejmości Dr Dominika Strapagiela z Pracowni Biobank Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego przy użyciu urządzenia NextSeq 500.

Analiza danych uzyskanych w wyniku sekwencjonowania RNASeq

Analiza w przy pomocy oprogramowania Geneious z wykorzystaniem nakładek: mapowanie programem Bowtie2 (*high sensitivity*) do matrycy szczepu wzorcowego *M. tuberculosis* NC_000962. Poziom ekspresji obliczano na podstawie tego samego oprogramowania z użyciem DESeq2 i dopasowania parametrycznego.

4.11. Elektrotransformacja komórek *M. tuberculosis*

W celu wprowadzenia materiału genetycznego do komórek *M. tuberculosis* stosowano metodę elektroporacji opracowaną przez Parish i Stocker w roku 2001. W metodzie tej impuls elektryczny przepływający przez komórki w roztworze 10% glicerolu destabilizuje błony komórkowe, co wpływa na zwiększenie przepuszczalności (Parish and Stocker 2001). Pierwszym etapem procedury jest hodowla *M. tuberculosis* na podłożu płynnym 7H9 Middlebrook suplementowanym OADC do OD₆₀₀=0,6–0,8. Następnie 10 ml hodowli wirowano w 3 900 g, 37°C i dwukrotnie płukano w 10% glicerolu. Ostatecznie uzyskane komórki kompetentne zawieszano w 100 µl 10% glicerolu. Następnie do tak przygotowanych komórek dodawano wyizolowany DNA plazmidowy w ilości 500 ng i przeprowadzano elektrotransformację w kuwecie z wykorzystaniem aparatu do elektroporacji przy następujących parametrach: napięciu 2,5 kV, oporze 1000 Ω i pojemności elektrycznej 25 µF. Następnie zawartość kuwety płukano 5 ml podłoża płynnego 7H9 Middlebrook z dodatkiem OADC oraz Tween 80 i inkubowano przez 24 godz. w 37°C. Następnie hodowlę wysiewano na podłoże 7H10 Middlebrook z dodatkiem OADC, glicerolu oraz kanamycyny jako czynnika selekcyjnego i inkubowano 37°C przez około 4-5 tygodni.

4.12. Przygotowanie rekombinowanych szczepów *M. tuberculosis* o stabilnej ekspresji białka zielonej fluorescencji oraz oporności na kanamycynę

W celu uzyskania szczepów rekombinowanych zastosowano znajdujący się w kolekcji IBM PAN plazmid pMV306attP_{erc3}*Mtb-gfp*. Dla wprowadzenia plazmidowego DNA do prątków gruźlicy zastosowano technikę elektroporacji. Selekcję rekombinantów przeprowadzono na podłożu stałym Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC, glicerolu

oraz czynnika selekcyjnego kanamycyny. Otrzymane rekombinowane szczepy były następnie oceniane pod kątem fluorescencji przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej.

4.13. Ocena fluorescencji przy pomocy mikroskopii świetlnej

Rekombinowane szczepy *M. tuberculosis* noszące plazmid integracyjny pMV306attP_{erc3_Mtb-gfp} hodowano na podłożu płynnym Middlebrook 7H9 z dodatkiem suplementu OADC do gęstości optycznej OD₆₀₀=0,6. Następnie hodowlę wirowano w warunkach 3 900 g, temperaturze pokojowej przez 10 minut. W zależności od ilości zebranej biomasy wirowanie powtarzano dwu lub trzykrotnie. Do osadu dodawano 4% PFA i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia na szkiełko podstawowe nakładano około 5 – 10 µl zawieszony w 4% PFA hodowli i czekali do wyschnięcia. Na przygotowane próbki następnie nakrapiano Mowiol® 4-88 i zakrywano szkiełkiem nakrywkowym. Następnie preparaty oglądano przy pomocy mikroskopu Nikon Eclipse TE 2000-U przy ustawieniach obiektywu 100x/1.25 przy użyciu fluorescencji z zakresu światła niebieskiego.

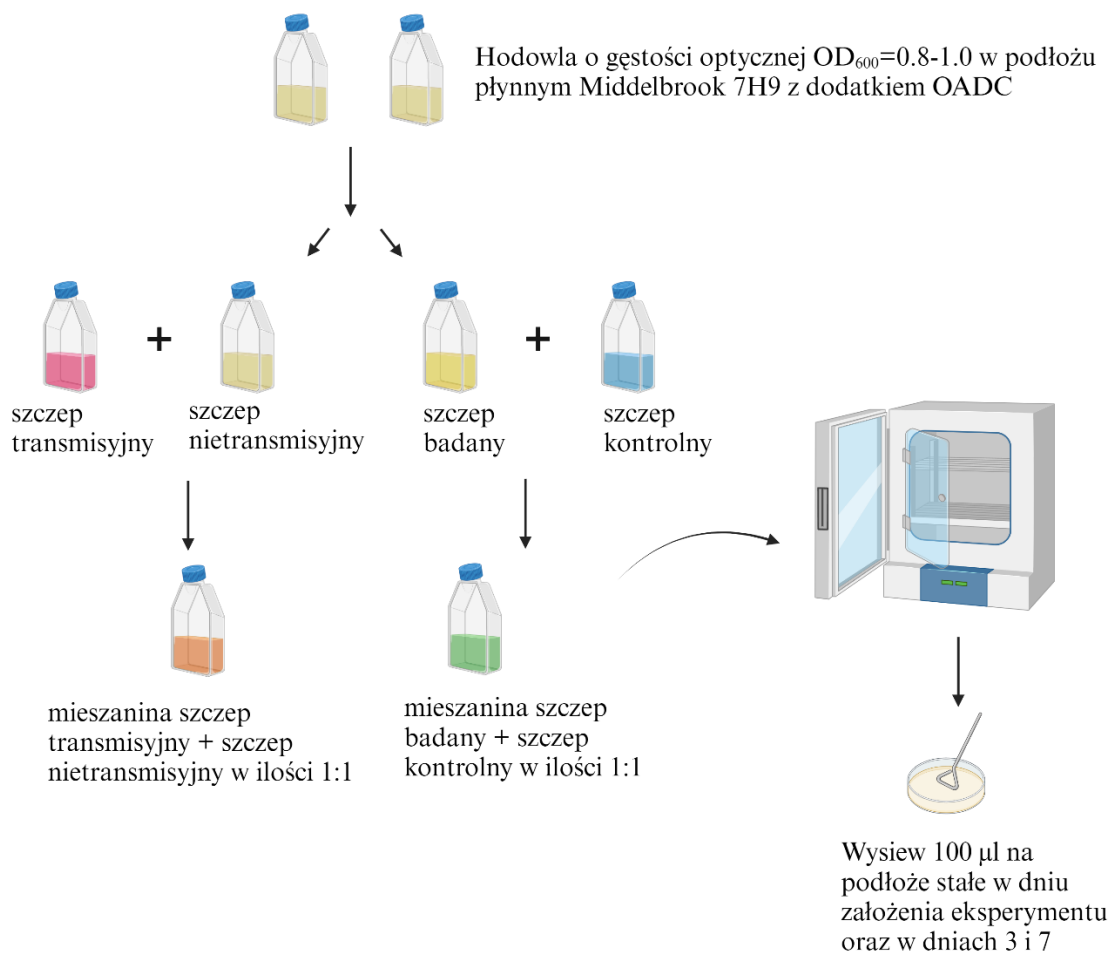
4.14. Określenie poziomu względnego oraz bezwzględnego dostosowania ewolucyjnego wybranych szczepów *M. tuberculosis* w testach kompetycyjnych

Szczepy *M. tuberculosis* hodowano w podłożu Middlebrook 7H9 suplementowanym OADC do gęstości optycznej OD₆₀₀=0,8 – 1,0 a następnie rozcieńczano tak, aby uzyskać 10 ml hodowli o gęstości 10⁶ bakterii/ml. Szczepy układano w pary – szczep transmisyjny ze szczepem nietransmisyjnym (względny poziom dostosowania) oraz szczep badany (z grupy wysokotransmisyjnych lub niskotransmisyjnych) ze szczepem kontrolnym *M. tuberculosis* ΔkatG (bezwzględny poziom dostosowania). Każdą analizowaną parę szczepów mieszano w równych objętościach – po 5 ml na butelkę hodowlaną, całkowita objętość łączonej hodowli wynosiła 10 ml. Hodowlę inkubowano w 37°C. Wykonywano szeregi rozcieńczeń w postępie geometrycznym i wysiewano 100 µl z rozcieńczeń 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ lub 10⁻⁷, odpowiednio w dniu założenia eksperymentu, w 3 oraz 7 dniu hodowli na podłożu stałe Middlebrook 7H10 suplementowanym OADC, z dodatkiem kanamycyny oraz bez antybiotyku, w celu określenia

liczby jednostek tworzących kolonie (ang. *colony forming units*, CFU). Współczynnik poziomu dostosowania obliczano na podstawie wyliczeń opublikowanych przez Kodio et al., 2019:

$$W = (\ln[R_f \div R_i] \div \ln[S_f \div S_i])$$

gdzie W oznacza współczynnik poziomu dostosowania szczepu, R to szczepy posiadające oporność a S to szczepy lekowrażliwe, R_i to wartość CFU dla szczepów opornych w dniu 0, natomiast R_f to wartość CFU dla szczepów opornych w dniu 7 (Kodio et al. 2019). Do obliczenia CFU wykorzystano liczbę kolonii uzyskiwanych na podłożu stałym Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC oraz czynnika selekcyjnego kanamycyny. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach. Dla każdej pary szczepów wyliczono współczynnik poziomu dostosowania i następnie z danych zbiorczych wyliczono medianę, odchylenie standardowe oraz rozłożenie kwartyłowe.

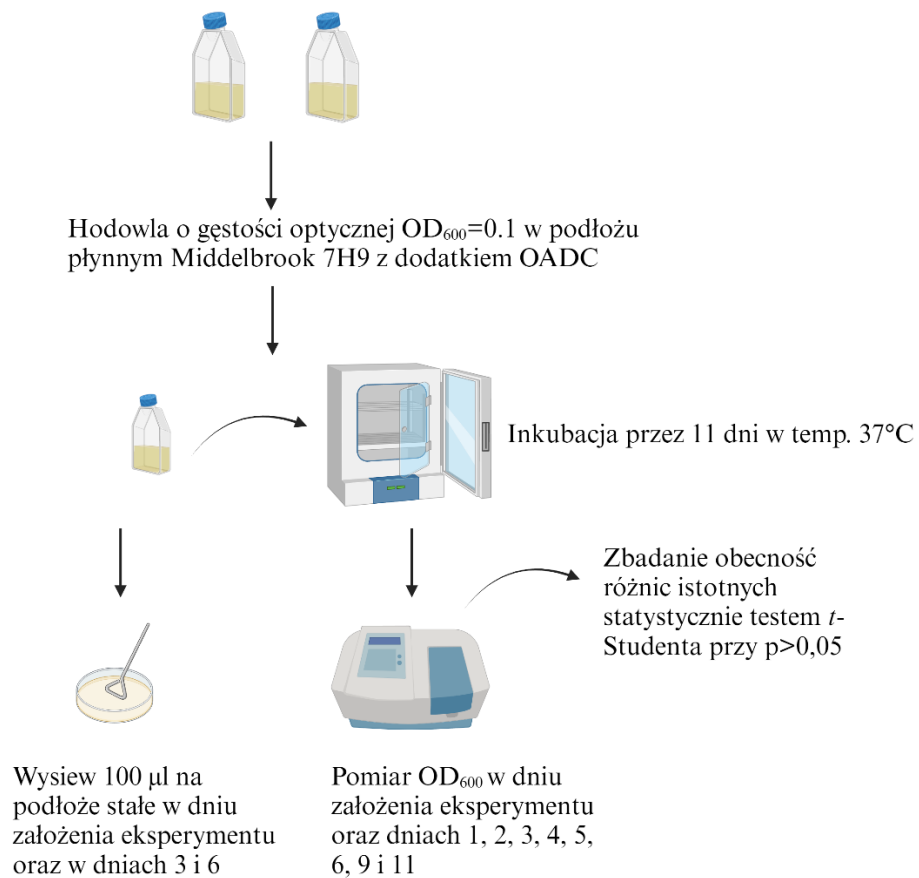


Ryc. 4.2. Metodyka oceny poziomu bezwzględnego oraz względnego poziomu dostosowania ewolucyjnego wybranych szczepów *M. tuberculosis* w testach kompetycyjnych.

4.15. Określenie kinetyki wzrostu wybranych szczepów *M. tuberculosis* w klasycznym inkubatorze hodowlanym

Hodowle *M. tuberculosis* prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w objętości 10 ml, w temperaturze 37°C do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,8-1,0$. Następnie hodowle rozcieńczano do wartości gęstości optycznej $OD_{600}=0,1$ i hodowano przez 11 dni w temperaturze 37°C i oceniano OD hodowli w dniach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11. Dodatkowo w dniach 0, 3 i 6, po wcześniejszym przygotowaniu rozcieńczeń hodowli

(10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} lub 10^{-7}) wysiewano po 100 μ l zawiesiny z poszczególnych rozcieńczeń na płytki z podłożem stałym Middlebrook 7H10 suplementowanym OADC w celu oszacowania CFU. Doświadczenie wykonywano w 3 powtórzeniach. Wyliczono średnie wartości gęstości optycznej dla hodowli poszczególnych szczepów, w poszczególnych punktach czasowych. Następnie zbadano normalność rozkładu wartości gęstości optycznych w grupach szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych i zbadano obecność różnic istotnych statystycznie testem *t*-Studenta przy $p > 0,05$.



Ryc. 4.3. Etapy wykonania eksperymentu oceniającego kinetykę wzrostu szczepów *M. tuberculosis*.

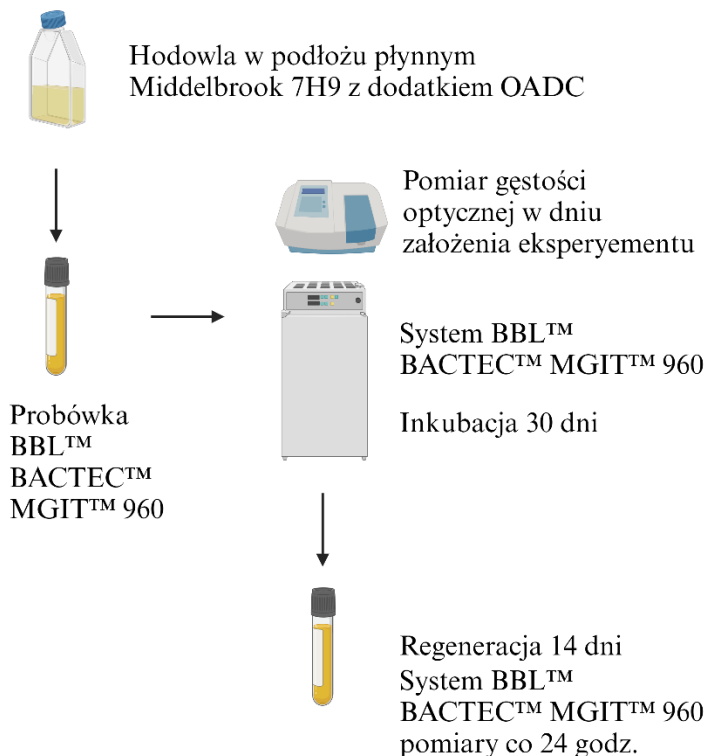
4.16. Określenie podstawowego i rozszerzonego profilu lekooporności wybranych szczepów *M. tuberculosis* przy użyciu testu molekularnego Genotype MTBDRplus ver. 2.0

Testy te wykonane zostały w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie zgodnie z zaleceniami producenta jak i zasadami postępowania z materiałem klinicznym pobranym od pacjentów. Rozszerzony profil lekooporności oceniony został poprzez wykonanie testu molekularnego Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Niemcy). W teście tym wyróżnia się następujące etapy: izolację DNA prątków gruźlicy, przeprowadzenie reakcji PCR z dołączonymi do zestawu starterami znakowanymi biotyną i następnie hybrydyzację produktów amplifikacji do nitrocelulozowej membrany. Wynik testu interpretuje się na podstawie obecności prążków widocznych na membranie. W teście tym określić można oporność na podstawowe tuberkulostatyki tj. ryfampicynę, izoniazyd, etambutol oraz dodatkowo na fluorochinolony, amikacynę, kapreomycynę i kanamycynę.

4.17. Określenie profilu odporności na warunki o obniżonej zawartości tlenu wybranych szczepów *M. tuberculosis*

Hodowle bakteryjne *M. tuberculosis* prowadzono na podłożu płynnym Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC do osiągnięcia gęstości zawiesiny równej 4,0 w skali McFarlanda w temperaturze 37°C. Do próbki BBL™ BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacteria Growth Indicator Tube dodawano 2 ml podłoża płynnego Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC, 800 µl suplementu OADC oraz 25 µl tyloxapolu. Następnie dodawano 500 µl zawiesiny bakteryjnej. Jako indykatora osiągnięcia stanu hipoksji użyto błękitu metylenu, który staje się bezbarwny w warunkach beztlenowych. Hodowle inkubowano przez 30 dni w temperaturze 37°C w systemie BACTEC™ MGIT™ 960. Następnie hodowle otwierano, rozcieńczano do gęstości zawiesiny równej 0,1 w skali McFarlanda i przenoszono do nowej próbki BBL™ BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacteria Growth Indicator Tube i inkubowano przez 14 dni. Pomiarów indeksu wzrostu MGIT dokonywano co 24 godz. przy pomocy urządzenia BACTEC™ MGIT™ 960. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach. Zbadano normalność rozkładu gęstości

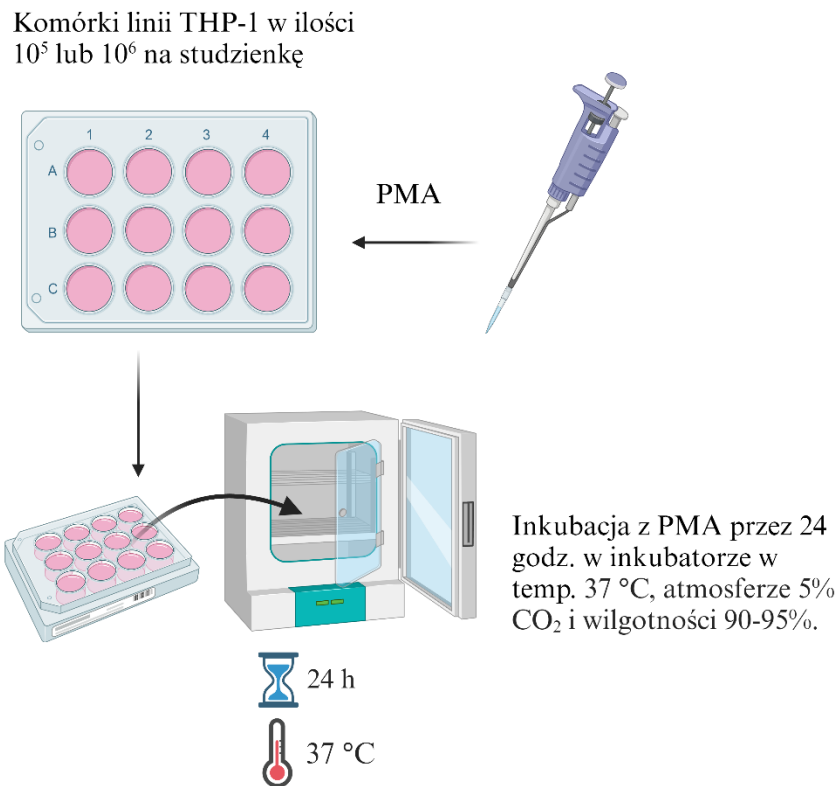
optycznych w grupach szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych i zbadano obecność różnic istotnych statystycznie testem *t*-Studenta przy $p > 0,05$.



Ryc. 4.4. Etapy określenia profilu odporności wybranych szczepów *M. tuberculosis* na warunki o obniżonej zawartości tlenu (opis w tekście).

4.18. Różnicowanie linii komórkowej THP-1 do makrofagów

Komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 różnicowano do makrofagów M0 podczas inkubacji z dodatkiem PMA w stężeniu 20 ng/ml. Komórki monocytów na płytkach 24-studzienkowych w ilości 10^5 lub 10^6 , w zależności od wykonywanego dalszego eksperymentu, inkubowano z PMA przez 24 godz. we wzbogaconym podłożu RPMI 1640 w inkubatorze w atmosferze 5% CO₂, wilgotności wynoszącej 90-95%, w temperaturze 37°C. Po 24 godz. oceniano stopień adherencji komórek na płytce 24-dołkowej oraz wymieniano podłoże na świeże wzbogacone medium RPMI 1640 (Ryc 4.5).

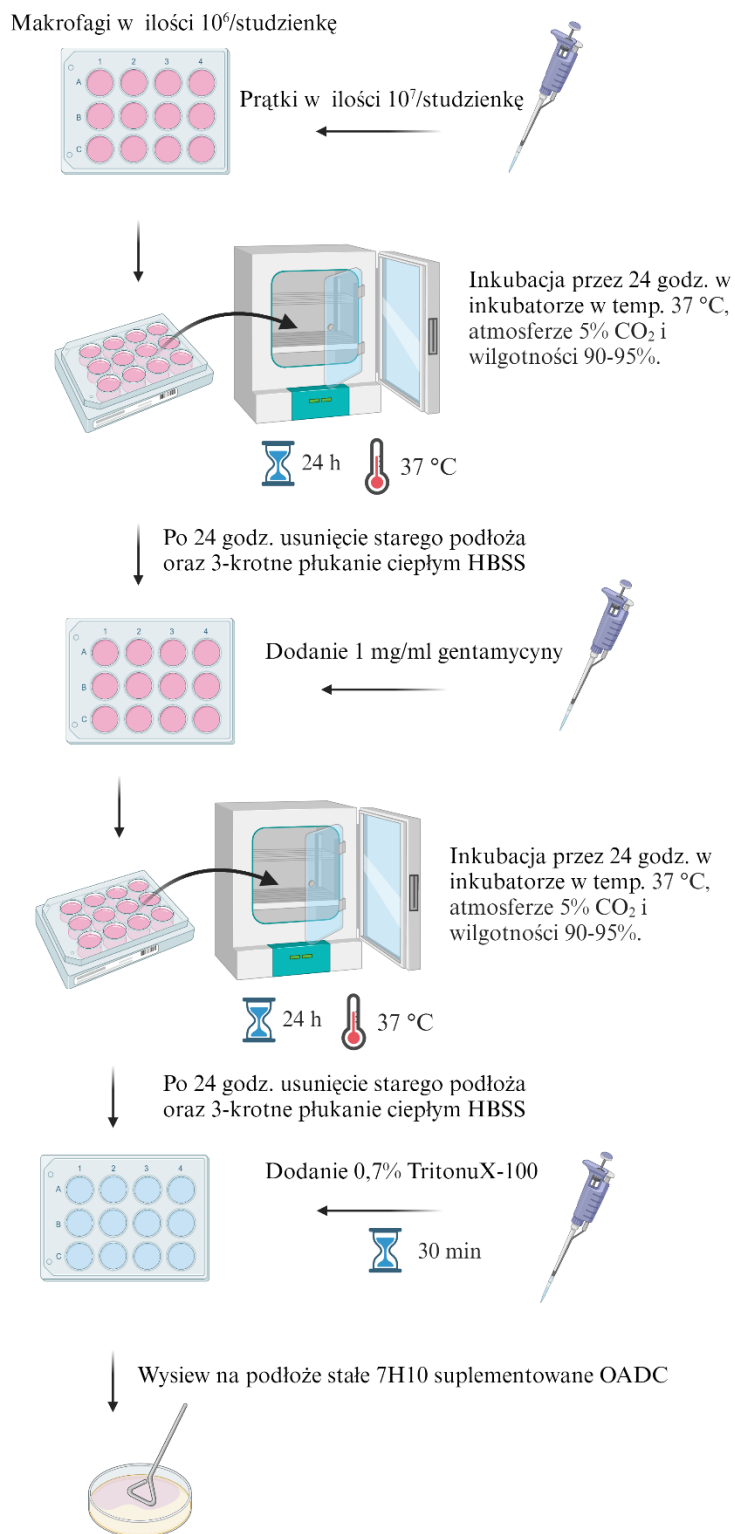


Ryc. 4.5. Uzyskiwanie makrofagów poprzez różnicowanie komórek linii THP-1 inkubowanych z PMA (opis w tekście).

4.19. Określenie poziomu pochłaniania wybranych szczepów *M. tuberculosis* przez makrofagi

Komórki linii THP-1 nanoszono na płytkę 24-studzienkową w ilości 10^5 na studzienkę i różnicowano do makrofagów wedle procedury 4.18. Różnicowanie linii komórkowej THP-1 do makrofagów. Następnie przygotowywano komórki bakteryjne do zakażenia poprzez zawieszenie bakterii we wzbogaconym podłożu RPMI 1640 w liczbie 10^6 CFU/ml (MOI 1:10). W zróżnicowanych makrofagach wymieniono podłoże na świeże zawierające prątki gruźlicy i inkubowano przez 2 godz. w atmosferze 5% CO₂, wilgotności wynoszącej 90-95%, w temperaturze 37°C. Następnie zakażone makrofagi płukano 3-krotnie ciepłym buforem HBSS oraz dodawano podłoże RPMI 1640 z gentamycyną w stężeniu 1 mg/ml i inkubowano 2 godz.

w takich samych warunkach. Następnie komórki płukano 3-krotnie ciepłym buforem HBSS oraz dodawano 1 ml zimnego 0,2% Tritonu-X 100 i inkubowano na lodzie przez 30 min. mieszając zarówno na początku, w trakcie, jak i pod koniec inkubacji. W celu oceny liczby żywych prątków CFU w lizacie makrofagów, przygotowywano szeregi rozcieńczeń i wysiewano po 100 μ l zawiesiny z rozcieńczeń 10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-3} na płytki z podłożem Middlebrook 7H10 suplementowanym OADC (Ryc. 4.6). Eksperyment wykonywano w 4 powtórzeniach. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu Manna-Whitneya.



Ryc. 4.6. Określenie poziomu pochłaniania wybranych szczepów *M. tuberculosis* przez makrofagi.

4.20. Określenie poziomu wewnątrzkomórkowego przeżywania w makrofagach wybranych szczepów *M. tuberculosis*

Komórki linii THP-1 nanoszono na płytkę 24-studzienkową w ilości 10^5 na studzienkę i różnicowano do makrofagów wedle procedury 4.18. Różnicowanie linii komórkowej THP-1 do makrofagów. Następnie przygotowywano zawiesinę bakteryjną 10^6 CFU/ml we wzbożonym podłożu RPMI 1640 i zakażano makrofagi (MOI 1:10). Inkubowano przez 2 godz. w atmosferze 5% CO₂, wilgotności wynoszącej 90-95%, w temperaturze 37°C. Następnie w celu pozbycia się bakterii znajdujących się na zewnątrz makrofagów, komórki płukano 3-krotnie ciepłym buforem HBSS oraz dodawano podłoże RPMI 1640 z gentamycyną o stężeniu 1 mg/ml i inkubowano 2 godz. w takich samych warunkach. Po czasie inkubacji komórki 3-krotnie płukano ciepłym buforem HBSS oraz dodawano wzbożone podłoże RPMI 1640 i inkubowano 48 godz. w atmosferze 5% CO₂, wilgotności 90-95%, w temperaturze 37°C. Po tym czasie komórki ponownie 3-krotnie płukano ciepłym buforem HBSS a następnie dodawano 1 ml zimnego 0,2% Tritonu-X 100 i inkubowano na lodzie przez 30 min. mieszając zarówno na początku, w trakcie, jak i pod koniec inkubacji w celu uzyskania lizatu makrofagów. W celu oceny liczby żywych bakterii, 100 µl zawiesiny lizowanych makrofagów, w odpowiednim rozcieńczeniach 10^0 , 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4} wysiewano na płytki z podłożem stałym Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC. Następnie zbadano normalność rozkładu uzyskanych wartości CFU poszczególnych szczepów w grupach szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych i zbadano obecność różnic istotnych statystycznie testem *t*-Studenta z korektą Welch'a przy $p > 0,05$.

4.21. Określenie profilu produkcji cytokin prozapalnych przez komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 infekowane wybranymi szczepami *M. tuberculosis*

Komórki linii THP-1 nanoszono na płytkę 24-studzienkową w ilości 10^6 na studzienkę i różnicowano do makrofagów wedle procedury opisanej powyżej (4.18. Różnicowanie linii komórkowej THP-1 do makrofagów). Następnie przygotowywano zawiesinę bakteryjną 10^7 CFU/ml we wzbożonym podłożu RPMI 1640. W zróżnicowanych makrofagach wymieniono

podłoże na świeże zawierające prątki grzyźlicy i inkubowano przez 2 godz. w atmosferze 5% CO₂, wilgotności wynoszącej 90-95%, w temperaturze 37°C. Następnie w celu pozbycia się bakterii znajdujących się na zewnątrz makrofagów, komórki płukano 3-krotnie ciepłym buforem HBSS oraz dodawano podłoże RPMI 1640 z gentamycyną o stężeniu 1 mg/ml i inkubowano 2 godz. w takich samych warunkach. Następnie zakażone makrofagi płukano 3-krotnie ciepłym buforem HBSS oraz dodawano wzbogacone podłoże RPMI 1640 i inkubowano 24 godz. w atmosferze 5% CO₂, wilgotności 90-95%, w temperaturze 37°C. Po inkubacji z nad komórek zbierano nadsącz i filtrowano go przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm. Zebrane nadsącze zostały zanalizowane metodą MAGPIX® System firmy Illumina w celu określenia stężeń następujących cytokin: G-CSF, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12p40, TNF-α, MIP-1α, MIP-1β. Doświadczenie wykonywano w czterech niezależnych od siebie powtórzeniach. Następnie zbadano normalność rozkładu wartości stężeń poszczególnych cytokin w grupach szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych i zbadano obecność różnic istotnych statystycznie testem *t*-Studenta z korektą Welch'a przy $p > 0,05$.

4.22. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w niniejszej rozprawie doktorskiej dokonano przy użyciu programu statystycznego GraphPad Prism 10.3.1 (GraphPad Software, Inc.) oraz Excel (Microsoft Word Office).

5. Wyniki

5.1. Identyfikacja szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych *M. tuberculosis* z kolekcji szczepów Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie oraz Instytutu Biologii Medycznej, Polskiej Akademii Nauk

Spośród kolekcji szczepów *M. tuberculosis* zdeponowanych w IGiChP na podstawie danych epidemiologicznych oraz wstępnego genotypowania metodami spoligotyping oraz MIRU-VNTR wybrano szczepy potencjalnie wysoko- i niskotransmisyjne. Dobór szczepów przeprowadzono zgodnie z wytycznymi opisanymi szerzej w rozdziale Metody 4.2 (Rozdział 4. Metody, podrozdział 4.2. Identyfikacja wysoko- i niskotransmisyjnych szczepów *M. tuberculosis* w obrębie kolekcji szczepów IGiChP w Warszawie). Biorąc pod uwagę dane dotyczące miejsca izolacji szczepu, a także dane epidemiologiczne zebrane w wyniku wywiadu lekarskiego, dane kliniczne oraz wyniki analizy spoligotyping, z kolekcji szczepów zgromadzonych w kolekcji IGiChP wybrano do badań łącznie 195 szczepów prątków gruźlicy, które spełniały kryteria przedstawione w Tabeli 4.1 w rozdziale Metody 4.2. W celu zwiększenia liczby badanych szczepów wybrano dodatkowe 58 izolatów znajdujących się w kolekcji IBM PAN. Szczepy te są częścią kolekcji 234 szczepów wyhodowanych z materiałów klinicznych od 228 pacjentów z terenu Łodzi w latach 2006-2007, które były przebadane metodami spoligotyping, MIRU-VNTR (*locus-15* i *locus-19*) oraz dodatkowo IS6110-RFLP (Krawczyk et al. 2011). Po wstępnych wynikach uzyskanych metodą WGS zdecydowano się na poszerzenie kolekcji o 44 szczepy pochodzące z IGiChP, które stanowiły dodatkową pulę szczepów niskotransmisyjnych. Ze szczepów tych wyizolowano genomowy DNA w celu wykonania wysokoprzepustowego sekwencjonowania zgodnie z metodami opisanymi w podrozdziałach 4.5., 4.9. Genomowy DNA wyizolowano również ze szczepów, dla których nie wykazano lokalnej transmisji. Szczepy niskotransmisyjne wybrane zostały na podstawie wyników spoligotyping i sekwencjonowania genomowego DNA spośród zsekwencjonowanych, niesklastrowanych szczepów. Szczepy te zebrano w Aneksie do niniejszej pracy doktorskiej.

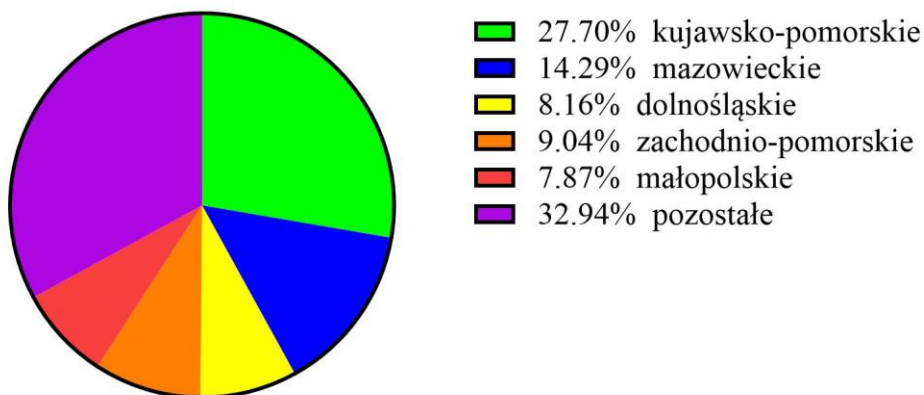
Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie genomowego DNA szczepów wybranych z kolekcji

Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie zrealizowano we współpracy z Pracownią Biobank Uniwersytetu Łódzkiego. Uzyskano biblioteki genomowego DNA dla wszystkich 347

szczepów (pochodzących z kolekcji IGiChP oraz z IBM PAN) natomiast po analizie jakości uzyskanych bibliotek, sekwencjonowanie przeprowadzono dla 326 szczepów.

Spośród 347 szczepów, kandydatów wybranych z obu kolekcji na podstawie analizy spoligotyping, 44 szczepy określono jako niskotransmisyjne, natomiast pozostałe jako wysokotransmisyjne, potencjalnie pochodzące z wybuchów epidemicznych. Wszystkie szczepy poddane sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu przedstawiono w Aneksie 1. Wybrane szczepy należały do dwóch linii filogenetycznych najbardziej rozpowszechnionych w Polsce – linii 4 oraz linii 2. Szczepy izolowano na przestrzeni kilkudziesięciu lat, najstarszy izolat pochodził z roku 2003, a najmłodszy z roku 2022. Większość szczepów pobrano od obywateli polskich a 28 od obcokrajowców. Na rycinie 5.1. przedstawiono szczegółowy rozkład danych dotyczących miejsca zamieszkania pacjentów, od których pobrano materiał kliniczny. Najwięcej izolatów pochodziło z województwa kujawsko-pomorskiego (28%), mazowieckiego (14%) oraz zachodnio-pomorskiego (9%).

Liczba izolatów pobranych od pacjentów wśród kolekcji IGiChP w zależności od województwa



Ryc. 5.1 Liczba analizowanych szczepów spośród kolekcji IGiChP w zależności od województwa.

Szczepy pochodziły od pacjentów z różnych środowisk m.in. z wybuchu ogniska epidemicznego wśród bezdomnych (63 szczepy) oraz od osób

zamieszkujących wspólne gospodarstwo domowe. W celu uniknięcia zaburzenia wyników badań asocjacyjnych genomów odrzucano szczepy pobierane wielokrotnie na przestrzeni lat od tego samego pacjenta w trakcie procesu leczenia. Szczepy reprezentowały 39 różnych spoligotypów.

5.2. Badania asocjacyjne wybranych z analizowanej kolekcji genomów szczepów *M. tuberculosis*

W pierwszym etapie badań asocjacyjnych określono linie filogenetyczne szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych *M. tuberculosis*. Analiza *in silico* pozwoliła na wyłonienie 23 klastrow szczepów wysokotransmisyjnych. Jednakże ze względu na występowanie szczepów lekoopornych oraz trudności technicznych związanych z ożywieniem szczepów, liczbę wybranych do dalszych badań klastrow zmniejszono do 13 (Tabela 5.1.). Szczepy pochodzące z dwóch wybuchów epidemicznych zostały pominięte w dalszych badaniach ze względu na niemożliwość ich ożywienia wynikającą prawdopodobnie z braku dostosowania do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych i zamrażania. Większość badanych szczepów pochodziła z linii filogenetycznej 4 natomiast jeden z linii 2. Wśród reprezentowanych podgrup linii filogenetycznej 4 wyróżniono sublinie Haarlem (38,5% szczepów), Ural (23,1%) oraz T (23,1%). Należy zauważyć, że zaobserwowaliśmy, w niektórych przypadkach niezgodność między spoligotypowaniem laboratoryjnym a *in silico*. Zjawisko to jest również obserwowane przez innych autorów i tłumaczone np. występowaniem zmienności w sekwencji DR (Genestet et al. 2022).

W celu dalszych analiz genetycznych i fenotypowych szczepy wysoko- i niskotransmisyjne dopasowano w pary. Przyjęto kryteria, że szczepy w parze powinny: 1) należeć do tej samej rodziny genetycznej na podstawie wyników zmienności sekwencji CRISPR-Cas (spoligotyping), 2) różnić się od siebie o nie mniej niż 100 mutacji punktowych (SNP), co datuje wspólnego przodka obu szczepów nie wcześniej niż 25 lat wstecz. 3) różnić się od siebie o nie więcej niż 400 SNP co datuje wspólnego przodka nie dalej niż 100. Kryteria te oparto o pojawianie się SNP z częstotliwością 0,5 SNP na genom na rok (Lee et al. 2015). Dla każdego szczepu wysokotransmisyjnego udało się dobrać szczep niskotransmisyjny według przyjętych kryteriów (Tabela 5.1.).

W trzecim etapie pracy mutacje w genomach szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych były porównywane ze sobą testem Fishera. Test ten pozwala na identyfikację istotnych statystycznie różnic w częstości pojawiania się poszczególnych mutacji między dwoma grupami szczepów, potencjalnie odpowiadających za zwiększoną lub zmniejszoną transmisyjność szczepów. Wykorzystując powyższy test statystyczny, w badanej kolekcji szczepów nie zidentyfikowano statystycznie znamiennych różnic w występowaniu poszczególnych mutacji wśród szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych.

Tabela 5.1. Podsumowanie informacji o szczepach reprezentujących grupy badane.

Nazwa szczepu	Kolekcja	Para niskotran smisyjna	Różnica SNP	Spoligotyp labolatoryjny	Spoligotyp WGS	Coll lineage WGS
G21	IGiChP	G23	170 SNP	3771	3771	2.2.1 / Beijing
G01	IGiChP	3835_NT	344 SNP	577735777420 771	7747777774 20771	4.2.1 / Ural
G87	IGiChP	384_NT	165 SNP	757777774020 771	7777777740 20771	4.1.2.1 / Haarlem
G101	IGiChP	4670_NT	199 SNP	757777776000 771	4020771	4.1.2.1 / Haarlem
G149	IGiChP	2904_NT	264 SNP	770000777660 731	7777777777 60731	4.8 / mainly T
L129/7	IBM PAN	7363_NT	335 SNP	774777777420 731	7777377774 20771	4.2.1 / Ural
L321	IBM PAN	936_NT	278 SNP	777737777420 771	7777377774 20771	4.2.1 / Ural
G17	IGiChP	748_NT	396 SNP	777777737760 571	7777767777 60771	4.1 / Euro- American
G151	IGiChP	8069_NT	192 SNP	777777174020 771	7777777740 20771	4.1.2.1 / Haarlem

G214	IGiChP	1396_NT	236 SNP	777777377760 771	777777777 60771	4.8 / mainly T
L306/7	IBM PAN	G191	110 SNP	777777770000 000	7777777700 00000	4.1.2.1 / Haarlem
L139	IBM PAN	5764_NT	106 SNP	777777774020 771	4020771	4.1.2.1 / Haarlem
G93	IGiChP	G206_NT	305 SNP	77777777760 771	777777777 60771	4.8 / mainly T

5.3. Określenie rozszerzonego profilu lekooporności wybranych szczepów

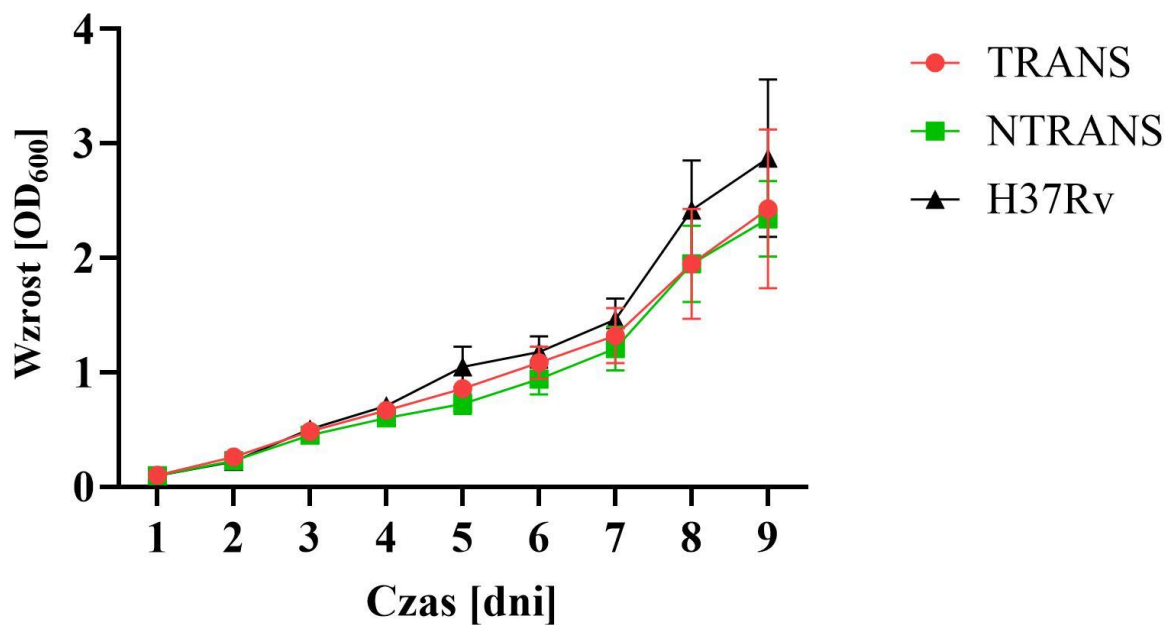
M. tuberculosis.

Do oceny rozszerzonego profilu lekooporności badanych szczepów zastosowano test HAIN, który wykazał, że 254 (74,0%) szczepy spośród całej kolekcji były wrażliwe na wszystkie analizowane antybiotyki. Z kolei 92 szczepy (26,8%) były szczepami lekoopornymi, w tym 4 (1,2%) szczepy były odporne jedynie na ryfampicynę, 4 (1,2%) odporne wyłącznie na izoniazyd, 25 (7,2%) szczepów było szczepami MDR, natomiast 35 (10,4%) szczepów było pre-XDR i 23 (6,7%) szczepami XDR. Z analiz wyłączono 4 szczepy, dla których nie udało się wykonać analizy HAIN. Przeprowadzenie powyższych badań było możliwe dzięki uprzejmości Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Analizy genomów *M. tuberculosis* z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania – WGS, pozwoliły na uzyskanie informacji o mutacjach pojawiających się w genomach badanych szczepów, które porównywano z opublikowaną przez WHO bazą (*Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance*, WHO, 2021) określającą związek mutacji z generowaniem lekooporności. Ze względu na brak wyników sekwencjonowania dla 16 badanych szczepów nie było możliwe przeprowadzenie powyższych analiz. Z przeprowadzonych badań wyodrębniono 71,9% szczepów wrażliwych na leki przeciwprątkowe, natomiast 24,2% szczepów było lekoopornych. Obie analizy wykazały zgodność pomiędzy metodą fenotypową oraz analizą obecności mutacji na poziomie 94,2% dla izoniazylu, 94,8% dla ryfampicyny, 84% dla etambutolu i 94,8% dla fluorochinolonów.

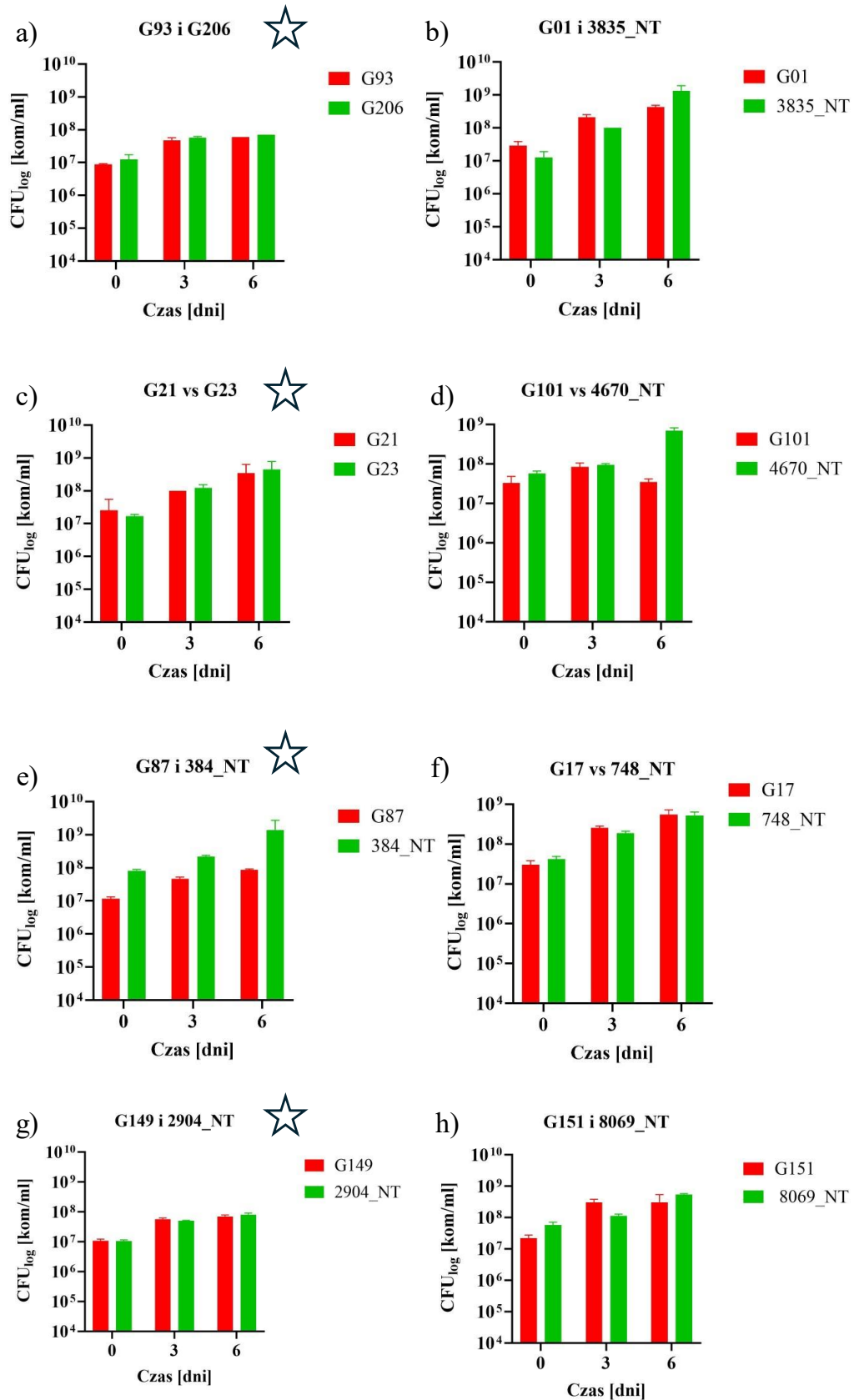
5.4. Analiza krzywej wzrostu 13 par szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych

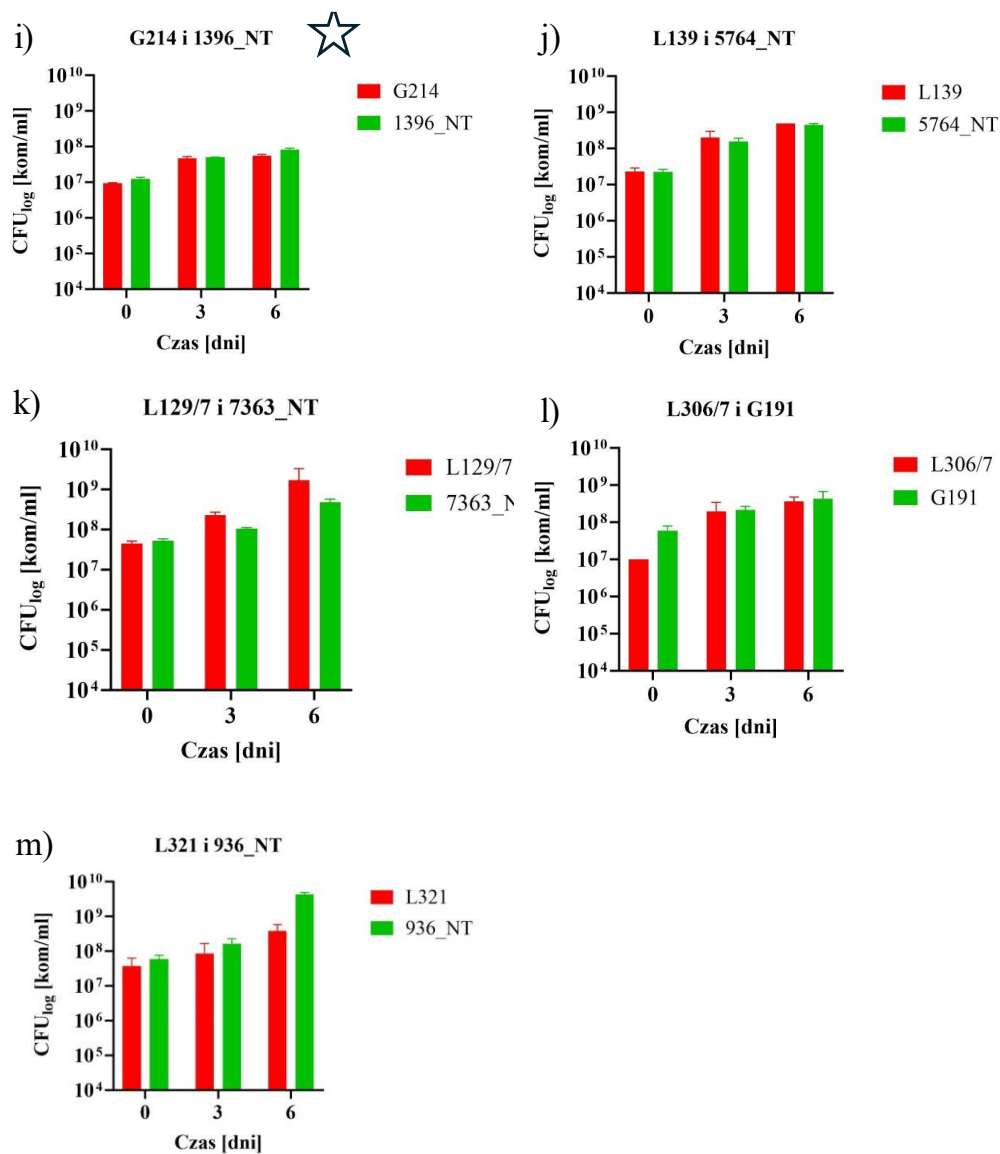
Nie wykazano istotnie statystycznych różnic w genotypach szczepów grup wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych, ale nie oznacza to, że nie mogą różnić się one fenotypami, które mogą wpływać na ich transmisyjność. Aby zweryfikować, czy wybrani reprezentanci grup szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych wykazują fenotypowe różnice we wzroście, dokonano analizy kinetyki wzrostu poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli (OD_{600}) oraz oszacowania liczby jednostek tworzących kolonie (CFU) w odpowiednich punktach czasowych, co opisano w podrozdziale Metody 4.15. Na podstawie uzyskanych danych wyznaczono krzywą wzrostu. Uzyskano wyniki krzywej wzrostu dla wszystkich 26 szczepów klinicznych oraz dla szczepu kontrolnego H37Rv. Dla wszystkich szczepów uzyskano pomiary gęstości optycznej hodowli, jednak dla 7 z nich nie udało się wyznaczyć wartości CFU ze względu na brak wzrostu na podłożu stałym Middlebrooka 7H10 z dodatkiem OADC. Dla szczepów, które nie wykazywały wzrostu na podłożach stałych, do oszacowania CFU użyto cytometru przepływowego. Wyniki CFU wykorzystano jedynie jako kontrolę krzywej wzrostu i nie analizowano ich statystycznie (Ryc. 5.3.). Następnie wyniki krzywych dla szczepów z grup wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych zostały ze sobą porównywane w teście statystycznym t-Studenta z korektą Welch'a (Ryc. 5.2). Wykorzystane w pracy szczepy obu grup nie charakteryzowały się istotnie statystycznymi różnicami we wzroście w warunkach laboratoryjnych.

Krzywa wzrostu szczepów



Ryc. 5.2. Krzywa wzrostu porównująca kinetykę wzrostu dla grup szczepów wysokotransmisyjnych (TRANS, czerwony kolor), niskotransmisyjnych (NTRANS, zielony kolor) oraz szczepu referencyjnego H37Rv (H37Rv, czarny kolor) w warunkach laboratoryjnych.

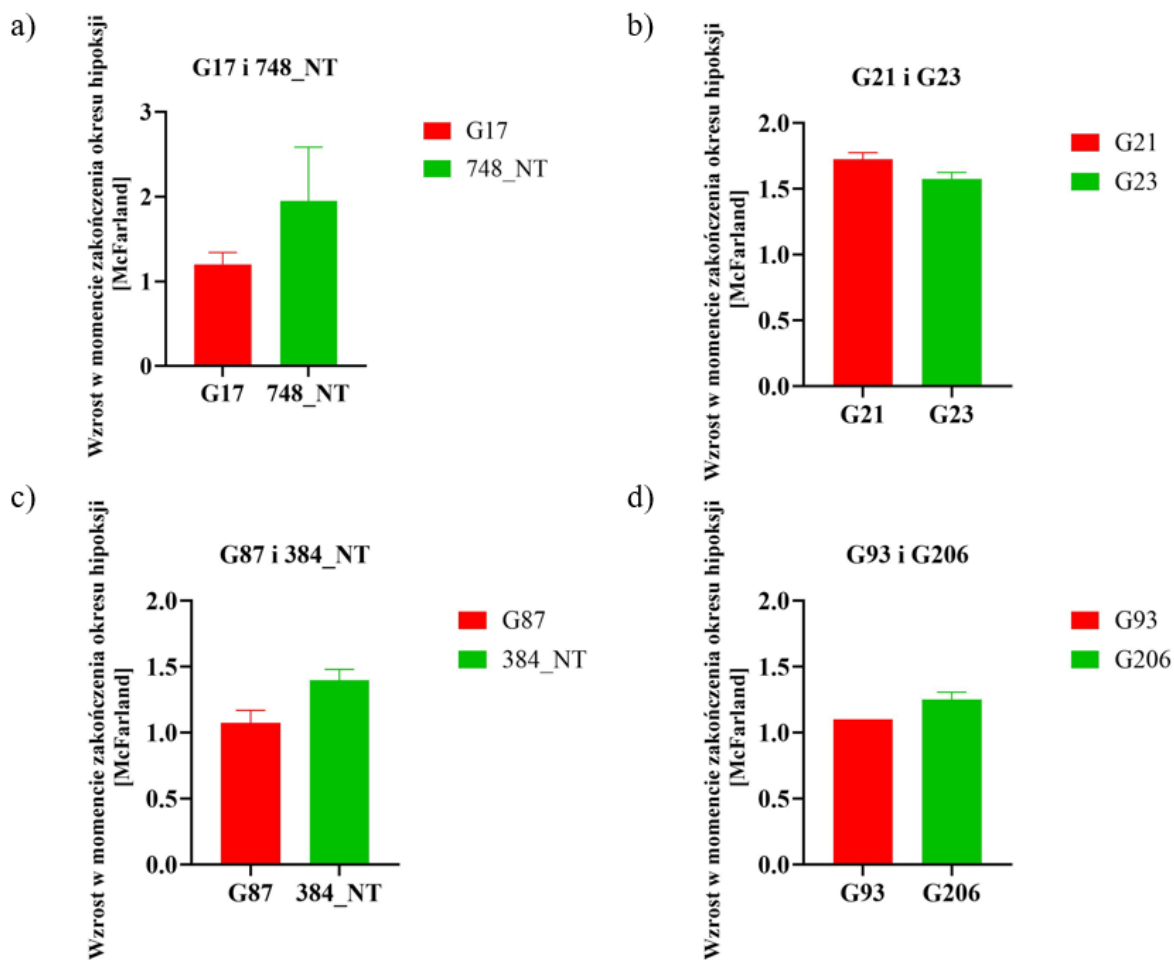


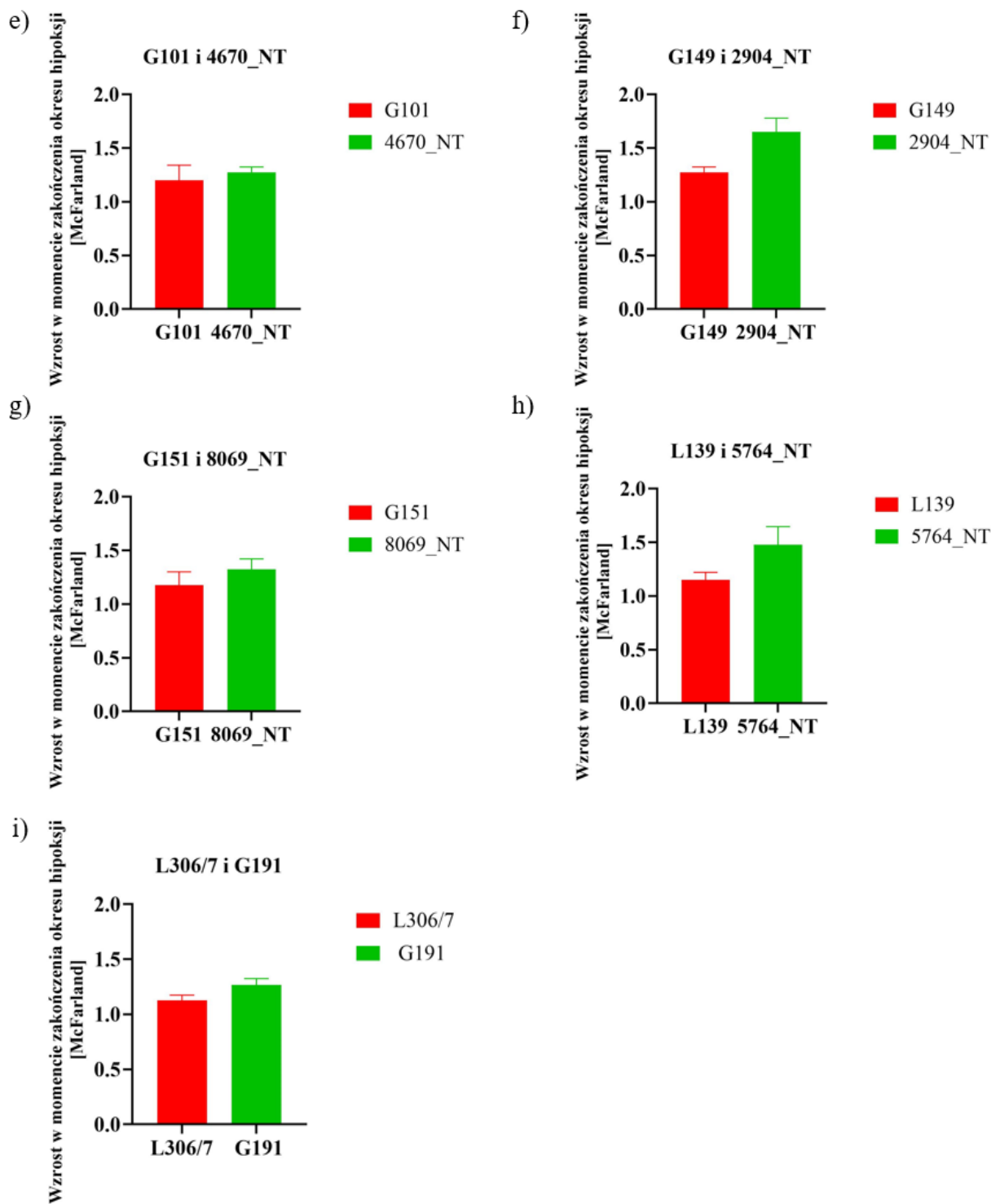


Ryc. 5.3. Kontrola kinetyki wzrostu w postaci log CFU (kom/ml, liczba komórek bakterii w jednym mililitrze hodowli) wybranych szczepów *M. tuberculosis* mierzona w dniach 0, 3 oraz 6. Na czerwono oznaczono szczepy wysokotransmisyjne a na zielono niskotransmisyjne, które przedstawiono na rycinie od a) do m) parami. Symbolem gwiazdki oznaczono szczepy, których pomiar CFU dokonano przy pomocy cytometrii przepływowej.

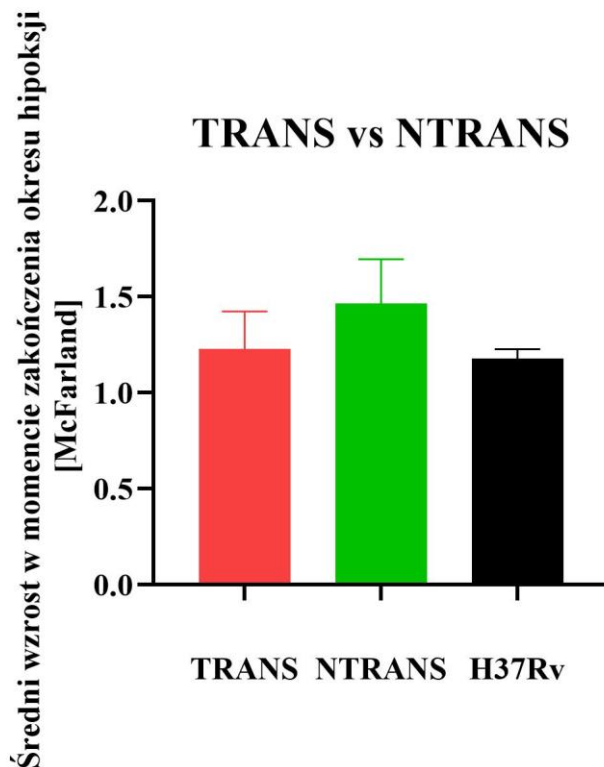
5.5. Określenie profilu odporności na warunki o obniżonej zawartości tlenu wybranych szczepów *M. tuberculosis*.

Wybrane szczepy *M. tuberculosis* hodowano w warunkach ograniczonego dostępu tlenu przez okres 30 dni. Po okresie wzrostu w warunkach ograniczonego dostępu tlenu dla szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych oceniono wzrost w skali McFarlanda. Eksperyment wykonano dzięki uprzejmości Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Nie zaobserwowano znaczących różnic we wzroście dla obu grup badanych szczepów (Ryc. 5.4).





Ryc. 5.4. Wzrost szczepów po zakończeniu hodowli w warunkach obniżonego stężenia tlenu. Na czerwono oznaczono szczepy wysokotransmisyjne a na zielono niskotransmisyjne, które przedstawiono na rycinach od a) do i) parami.

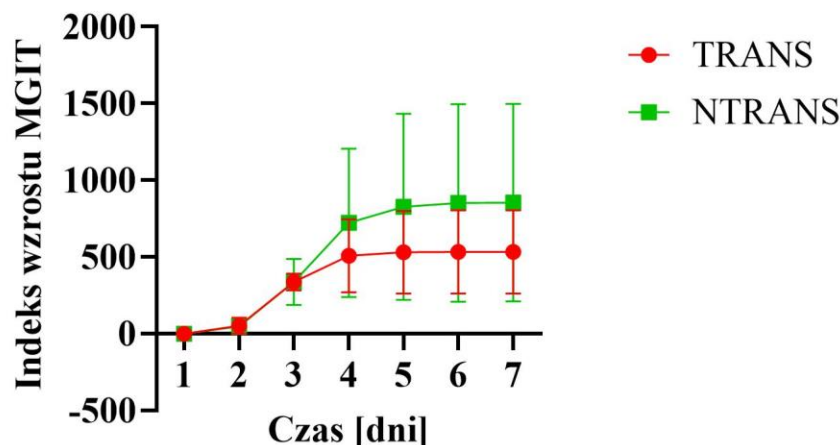


Ryc. 5.5. Średni wzrost szczepów z grup wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych po zakończeniu hodowli w warunkach obniżonego stężenia tlenu. Na czerwono oznaczono szczepy wysokotransmisyjne (TRANS) a na zielono niskotransmisyjne (NTRANS). Kolorem czarnym oznaczono szczep referencyjny H37Rv.

Po 30 dniowym okresie inkubacji w warunkach ograniczonej dostępności tlenu, hodowlę rozcieńczano w świeżym, wzbogaconym podłożu płynnym 7H9 z dodatkiem Tween 80 oraz OADC i inkubowano w warunkach tlenowych, obserwując zdolność szczepów reprezentujących grupę wysokotransmisyjną oraz niskotransmisyjną do regeneracji. W tym celu w zautomatyzowanym systemie hodowli prątków wyznaczono krzywe wzrostu dla 16 szczepów klinicznych podczas regeneracji po wzroście w warunkach ograniczonego dostępu tlenu dla par szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych. Wyniki porównano ze sobą testem statystycznym Manna-Whitneya (Ryc. 5.6). Nie uzyskano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami szczepów. Zaobserwowano natomiast, że wysoka zdolność

do regeneracji po okresie wzrostu w warunkach hipoksji, jest cechą zależną od szczepu i może być charakterystyczna w badanych parach zarówno dla szczepu z grupy wysokotransmisyjnych (G87, L306/7), jak i niskotransmisyjnych (G23, G206, 8069NT).

Wzrost (regeneracja) po okresie wzrostu w warunkach hipoksji



Ryc. 5.6. Wzrost szczepów *M. tuberculosis* podczas okresu regeneracji po wzroście w warunkach obniżonego tlenu. Na czerwono oznaczono szczepy wysokotransmisyjne (TRANS) a na zielono niskotransmisyjne (NTRANS).

5.6. Określenie poziomu dostosowania ewolucyjnego wybranych szczepów *M. tuberculosis* w testach kompetycyjnych.

Konstrukcja rekombinowanych szczepów *M. tuberculosis* noszących integracyjny plazmid pMV306attP_{ercc3}Mtb-gfp z wykorzystaniem rekombinacji miejscowo-specyficznej

Do uzyskania szczepów rekombinowanych wykorzystano plazmid integracyjny pMV306 noszący gen *gfp* kodujący białko zielonej fluorescencji, znajdujący się pod kontrolą silnego promotora genu *ercc3*. Plazmid został wprowadzony do komórek klinicznych 13 szczepów *M. tuberculosis* przy pomocy elektroporacji (rozdział Metody, podrozdział 4.11). Uzyskanie szczepów rekombinowanych potwierdzono przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej (rozdział Metody 4.13). Otrzymane rekombinowane szczepy prątków noszące plazmid pMV306-attP_{ercc3}Mtb-gfp charakteryzowały się fluorescencją oraz opornością na kanamycynę.

Uzyskano 9 szczepów rekombinowanych, u których potwierdzono ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP) przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej (Tabela 5.2.). W dalszej kolejności, szczepy te zostały wykorzystane w badaniach poziomu dostosowania ewolucyjnego. Dla 4 szczepów klinicznych *M. tuberculosis* mimo wielokrotnych prób elektroporacji, nie udało się uzyskać pożądanych rekombinantów.

Tabela 5.2. Uzyskane rekombinowane szczepy *M. tuberculosis* posiadające plazmid pMV306-*attP_{erc3}-gfp*.

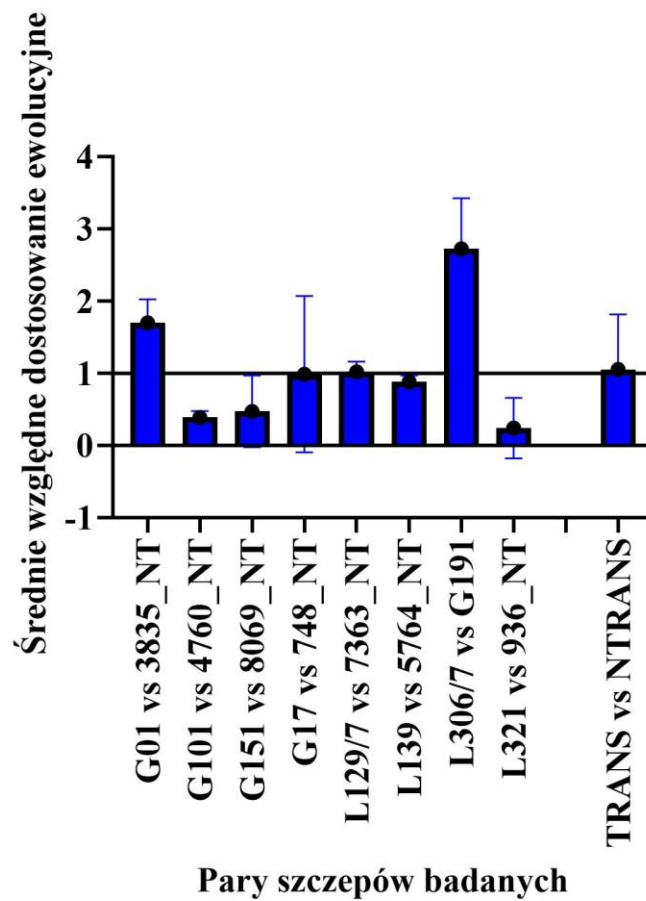
Nazwa szczepu
<i>MtbG01</i> pMV306KANgfp
<i>MtbG101</i> pMV306KANgfp
<i>MtbG17</i> pMV306KANgfp
<i>MtbG149</i> pMV306KANgfp
<i>MtbG151</i> pMV306KANgfp
<i>MtbL129/7</i> pMV306KANgfp
<i>MtbL139</i> pMV306KANgfp
<i>MtbL306/7</i> pMV306KANgfp
<i>MtbL321</i> pMV306KANgfp

Uzyskanie rekombinowanych szczepów klinicznych *M. tuberculosis* noszących plazmid pMV306-*attP_{erc3}-gfp* z genem *aph*, warunkującym oporność na kanamycynę, pozwoliło na wspólną hodowlę par szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych i ich różnicowanie na podłożach selekcyjnych w celu wykonania testów kompetycji. Na podstawie metodologii opisanej w rozdziale Metody 4.14 wyznaczano współczynnik poziomu dostosowania. Aby ograniczyć zmienną zakłócającą efekt pierwotny w postaci utraty plazmidu obliczono współczynnik gubienia plazmidu na podstawie utraty oporności na kanamycynę poprzez pomnożenie wartości jednostek koloniotwórczych (CFU), otrzymanych na podłożu stałym Middlebrooka 7H10 suplementowanych OADC z dodatkiem kanamycyny, uzyskanej w dniu założenia eksperymentu (dzień 0) dla badanej pary szczepów oraz dla szczepu odznaczającego się opornością na kanamycynę. Następnie wyliczono współczynnik W z uwzględnieniem współczynnika gubienia plazmidu noszącego oporność na kanamycynę.

Współczynniki uśredniono w obrębie powtórzeń a następnie porównano między parami obliczając średnie względne dostosowanie ewolucyjne (Ryc. 5.7.).

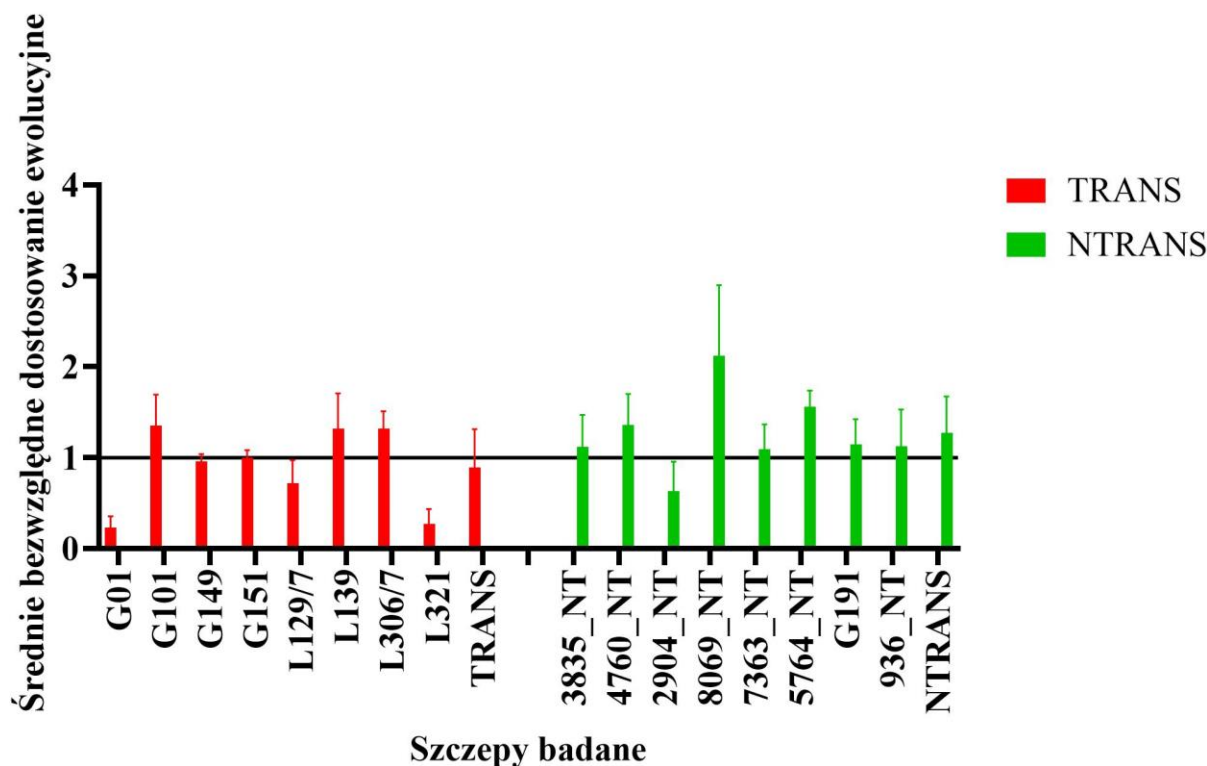
W kolejnym etapie pracy porównywano dostosowanie ewolucyjne szczepów transmisyjnych i niskotransmisyjnych wobec szczepu kontrolnego *M. tuberculosis* $\Delta katG$. Szczep ten jest mutantem szczepu *M. tuberculosis* H37Rv, pozbawionym funkcjonalnego genu katalazy, co prowadzi do jego oporności na izoniazyd. Hodując kliniczne szczepy wysoko- i niskotransmisyjne w obecności szczepu *M. tuberculosis* $\Delta katG$ wyznaczono bezwzględny poziom dostosowania szczepów nisko- i wysokotransmisyjnych. Średnia wartość dostosowania szczepów nisko- i wysokotransmisyjnych wynosiła 0,89 dla szczepów wysokotransmisyjnych i 1,27 dla szczepów niskotransmisyjnych, i nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych (Ryc. 5.8).

Poziom względnego dostosowania ewolucyjnego par uzyskanych rekombinantów



Ryc. 5.7. Średnie względne dostosowanie ewolucyjne dla wybranych sparowanych szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych, jak i uśredniony poziom dostosowania względnego dla szczepów wysokotransmisyjnych (TRANS) oraz niskotransmisyjnych (NTRANS).

Poziom bezwzględnego dostosowania ewolucyjnego szczepów



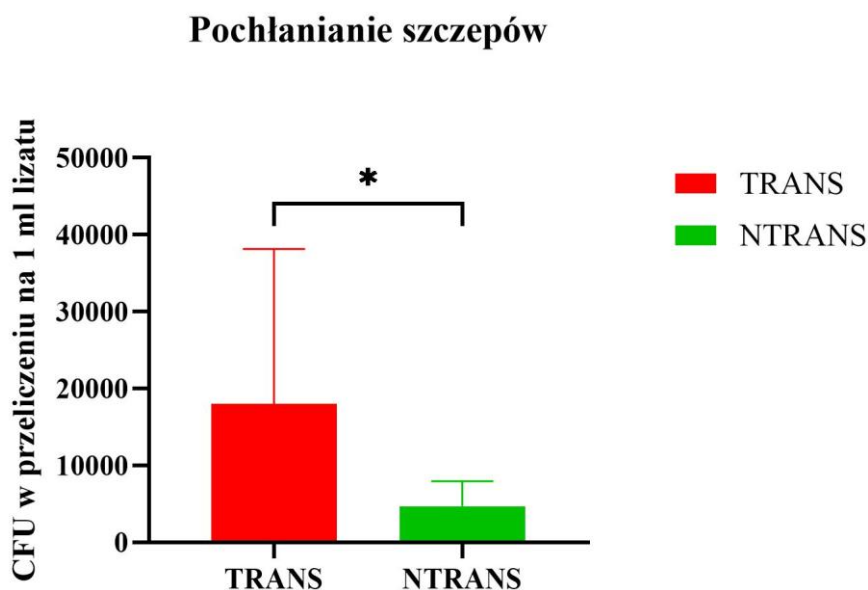
Ryc. 5.8. Średnie bezwzględne dostosowanie ewolucyjne dla wybranych sparowanych szczepów wysokotransmisyjnych (oznaczonych na czerwono, TRANS) oraz niskotransmisyjnych (oznaczonych na zielono, NTRANS).

5.7. Określenie poziomu wewnątrzkomórkowego pochłaniania i poziomu przeżywania w makrofagach wybranych szczepów *M. tuberculosis*.

Prątki gruźlicy to patogeny wewnątrzkomórkowe, zdolne do przeżywania wewnątrz makrofagów gospodarza. Istotnym elementem w transmisyjności szczepów *M. tuberculosis* może być ich pochłanianie przez profesjonalne makrofagi oraz zdolność do wewnątrzkomórkowego przeżywania. Dlatego też, dla obu badanych grup szczepów klinicznych *M. tuberculosis* oceniano poziom ich pochłaniania oraz wewnątrzkomórkowego przeżywania. W tym celu zastosowano linię THP-1 będącą ludzką linią komórek monocytarnych pochodzącą od pacjenta z ostrą białaczką monocytową.

Określenie poziomu pochłaniania wybranych szczepów *M. tuberculosis* przez makrofagi.

Komórki linii THP-1 nanoszono na płytkę 24-studzienkową w ilości 1×10^5 i różnicowano do makrofagów z użyciem PMA zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale Metody 4.18. Następnie komórki infekowano poszczególnymi szczepami prątków gruźlicy w liczbie 10 komórek bakteryjnych na 1 makrofaga (MOI = 1:10). Po 2-godzinnym okresie inkubacji w 37°C, podczas którego następował proces fagocytozy odpłukiwano zewnątrzkomórkowe bakterie, a następnie dodawano gentamycyny w celu zabicia prątków znajdujących się na zewnątrz makrofagów. Następnie makrofagi lizowano a uwolnione bakterie wysiewano na podłoże stałe w celu oceny liczby żywych komórek (CFU). Uzyskane wyniki CFU dla obu grup szczepów przeliczono na 1 ml uzyskanego lizatu i porównano ze sobą testem Manna-Whitneya. Pochłanianie szczepów z grupy wysokotransmisyjnej było statystycznie istotnie wyższe niż grupy niskotransmisyjnej ($p = 0.0281$) (Ryc. 5.9).

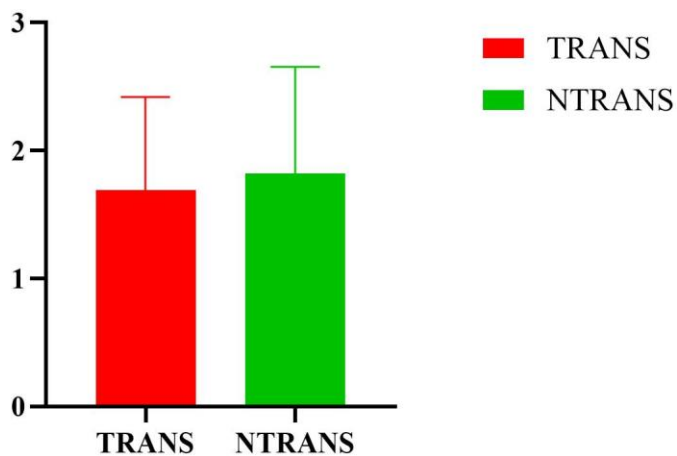


Ryc. 5.9. Pochłanianie prątków z grup wysokotransmisyjnych (TRANS, oznaczonych na czerwono) oraz niskotransmisyjnych (NTRANS, oznaczonych na zielono) przez makrofagi.

Określenie poziomu wewnątrzkomórkowego przeżywania w makrofagach wybranych szczepów *M. tuberculosis*.

Dla oceny wewnątrzkomórkowego przeżywania badanych szczepów *M. tuberculosis*, zróżnicowane do makrofagów komórki linii THP-1 infekowano jak opisano powyżej, natomiast po zabiciu zewnątrzkomórkowych, nie pochłoniętych przez makrofagi bakterii, komórki inkubowano przez 0 (grupa kontrolna) oraz 48 godzin, a następnie lizowano i uwalniano z nich prątki, które wysiewano z odpowiednich rozcieńczeniach na podłoża stałe w celu określenia liczby żywych bakterii (CFU). Dla każdego szczepu oceniano liczbę żywych prątków izolowanych po 48 godzinach inkubacji w porównaniu do liczby prątków pochłoniętych przez makrofagi (czas 0). Uzyskane wyniki CFU dla obu grup szczepów przeliczono na 1 ml uzyskanego lizatu, następnie obliczano iloczyn wzrostu liczby bakterii po 48 godz. inkubacji w makrofagach i porównano ze sobą testem *t*-Studenta z poprawką Welch'a. Przeżywanie szczepów z grupy wysokotransmisyjnej nie było statystycznie istotnie wyższe niż grupy niskotransmisyjnej ($p = 0.7451$) (Ryc. 5.10).

Iloczyn wzrostu liczby bakterii po 48 godz. inkubacji w makrofagach



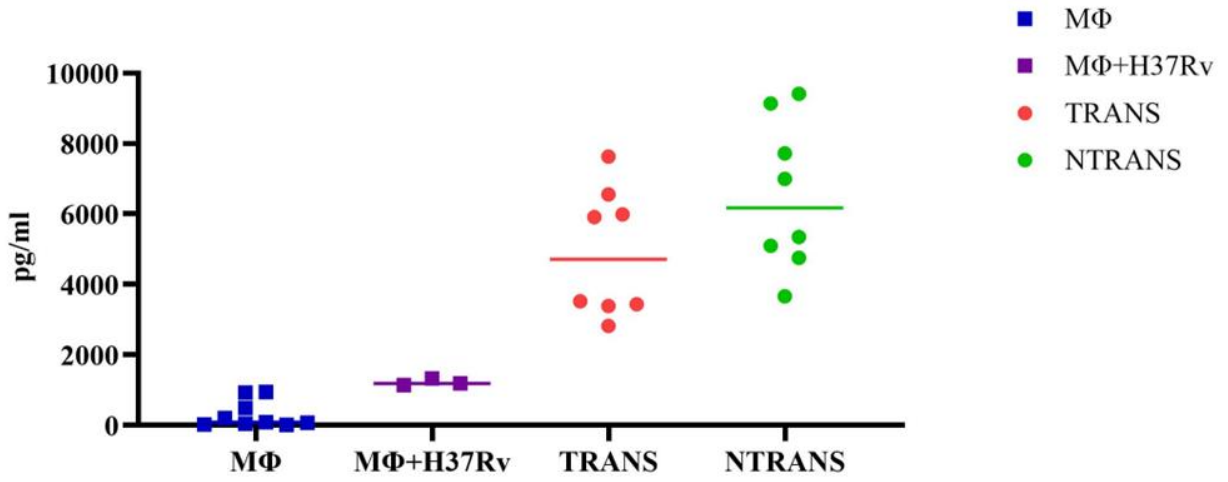
Ryc. 5.10. Iloczyn wzrostu prątków z grupy szczepów wysokotransmisyjnych (TRANS, oznaczonych na czerwono) oraz niskotransmisyjnych (NTRANS, oznaczonych na zielono) po 48 godz. inkubacji w makrofagach.

5.8. Określenie profilu produkcji cytokin prozapalnych przez komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 infekowanych wybranymi szczepami *M. tuberculosis*.

Makrofagi jako profesjonalne fagocyty, charakteryzują się zdolnością do indukowanej produkcji szeregu cytokin w odpowiedzi na obecność patogenu, w tym prątka gruźlicy. Prątki mają zdolność do aktywnego wpływania na funkcjonalną odpowiedź makrofagów, w tym na modulację odpowiedzi prozapalnej (Kawka et al. 2023). Dlatego też, oceniając szczepy kliniczne z grupy wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych szczepów postanowiono ocenić ich zdolność do indukcji odpowiedzi prozapalnej przez ludzkie makrofagi. Zbadano, czy komórki THP1 zróżnicowane do makrofagów infekowane szczepami wysokotransmisyjnymi i niskotransmisyjnymi produkują ten sam czy różny profil cytokin prozapalnych. Makrofagi różnicowano zgodnie z metodologią opisaną w rozdziale Metody 4.18. Następnie makrofagi infekowano poszczególnymi szczepami klinicznymi *M. tuberculosis*, zaliczanymi do obu badanych grup, przy wartości MOI = 1:10 i inkubowano przez 2 godziny. W kolejnym kroku niepochlónięte bakterie odpłukiwano i dodawano podłoże RPMI 1640 z gentamycyną w stężeniu 1 mg/ml, aby zabić zewnątrzkomórkowe prątki. Makrofagi inkubowano 24 godz. i zbierano nadsącz, który zanalizowano metodą MAGPIX® System firmy Illumina. Oznaczono cytokiny takie jak: IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF, IL-12p40, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α . Uzyskane dane przanalizowano pod kątem zawartości wymienionych cytokin w pg/ml w nadsączach makrofagów infekowanych badanymi szczepami. W badanych nadsączach zaobserwowano natomiast wysokie stężenia IL-1 β , IL-8, MIP-1 α oraz MIP-1 β . Następnie wyniki uśredniono dla grup szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych i porównano ze sobą przy pomocy testu statystycznego *t*-Studenta z korektą Welch. Nie zauważono istotnie statycznych różnic dla obu grup szczepów dla żadnej z analizowanych cytokin. Natomiast dla cytokin IL-1 β , IL-8, MIP-1 α zaobserwowano silną indukcję zarówno w obecności szczepów TRANS jak i NTRANS, jednak bez istotnych statystycznie różnic w poziomie indukcji zależnej od wykorzystanej do infekcji grupy szczepów (Ryc. 5.11).

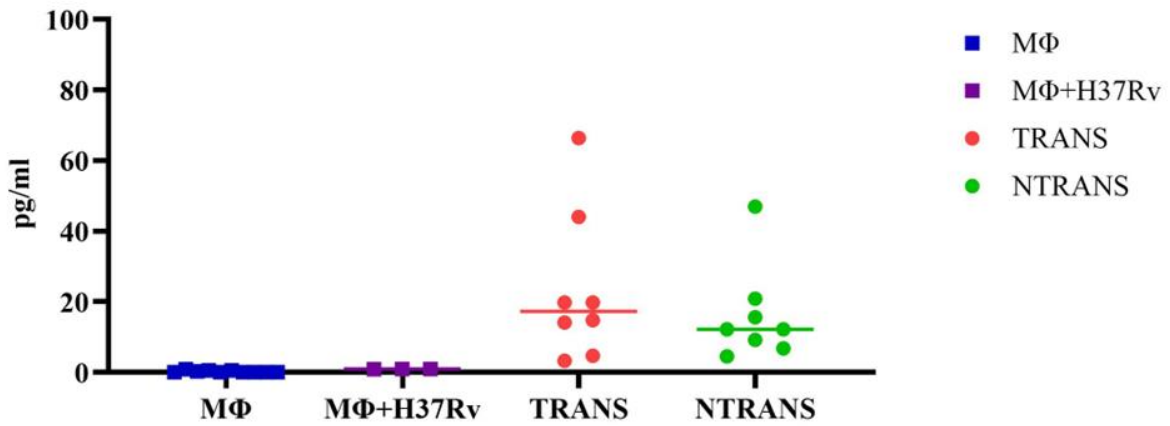
A)

IL-1 β

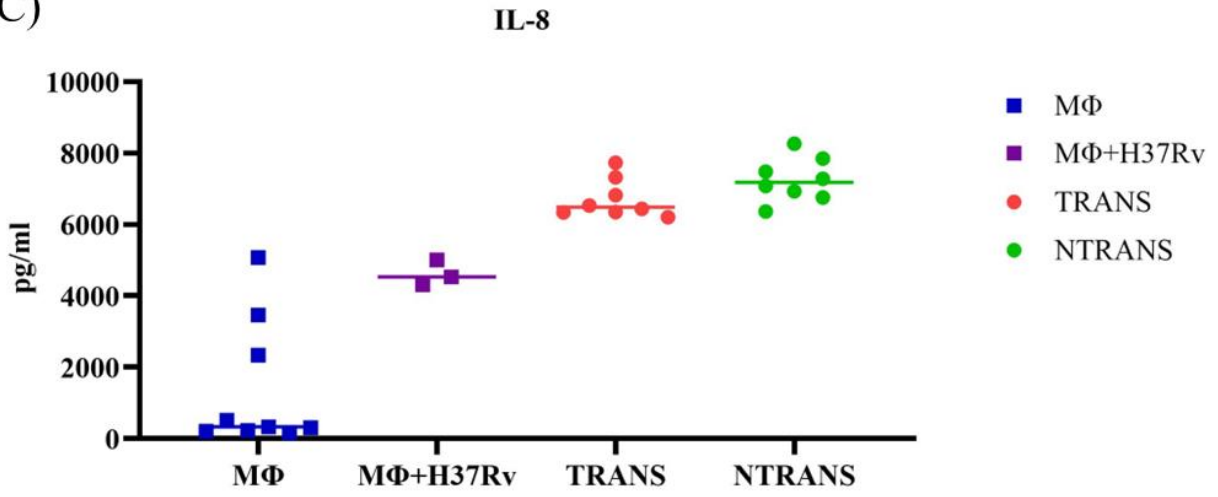


B)

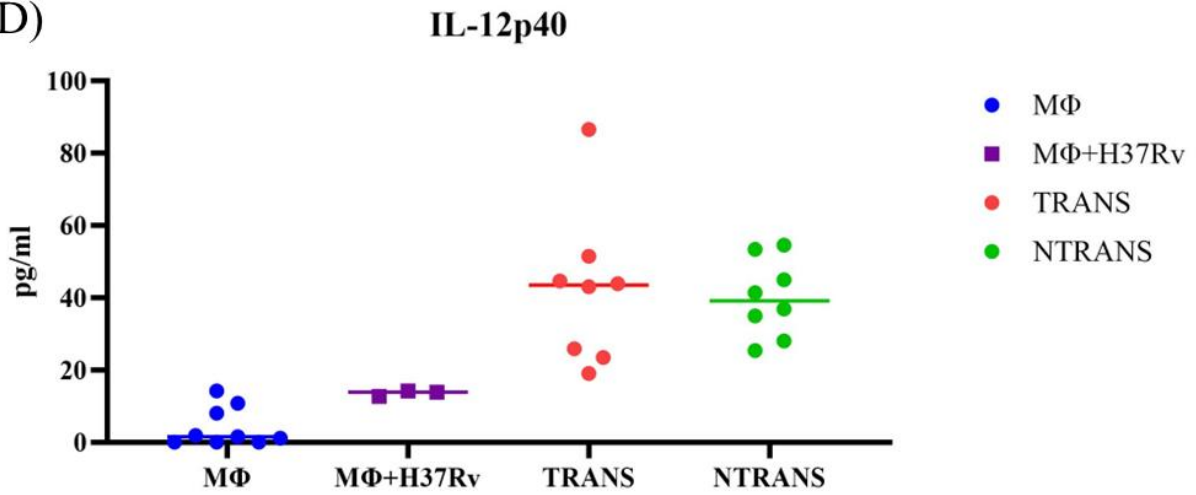
IL-6



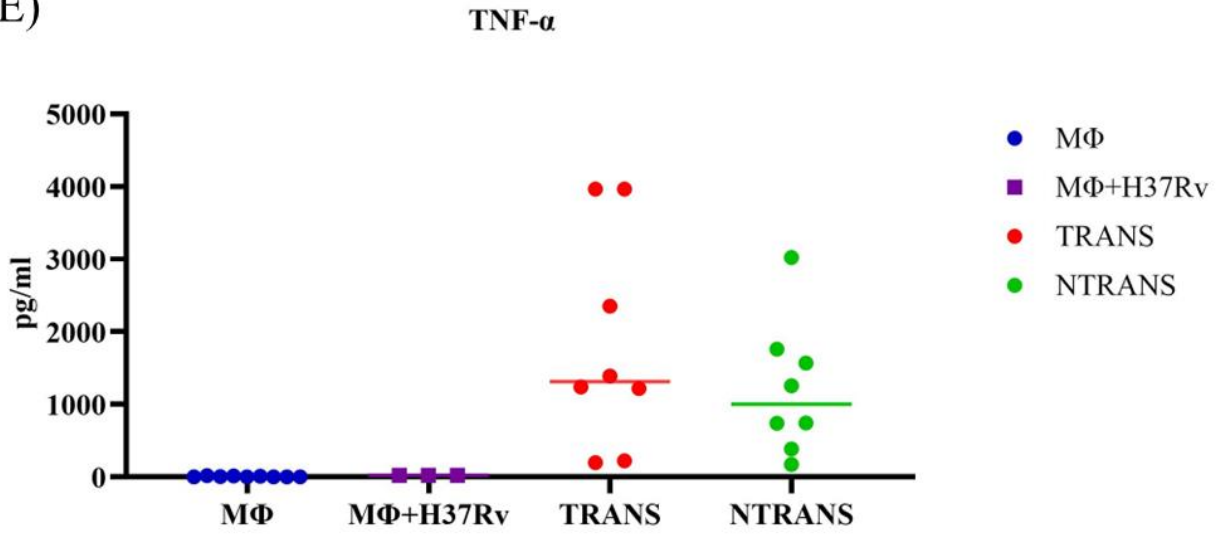
C)



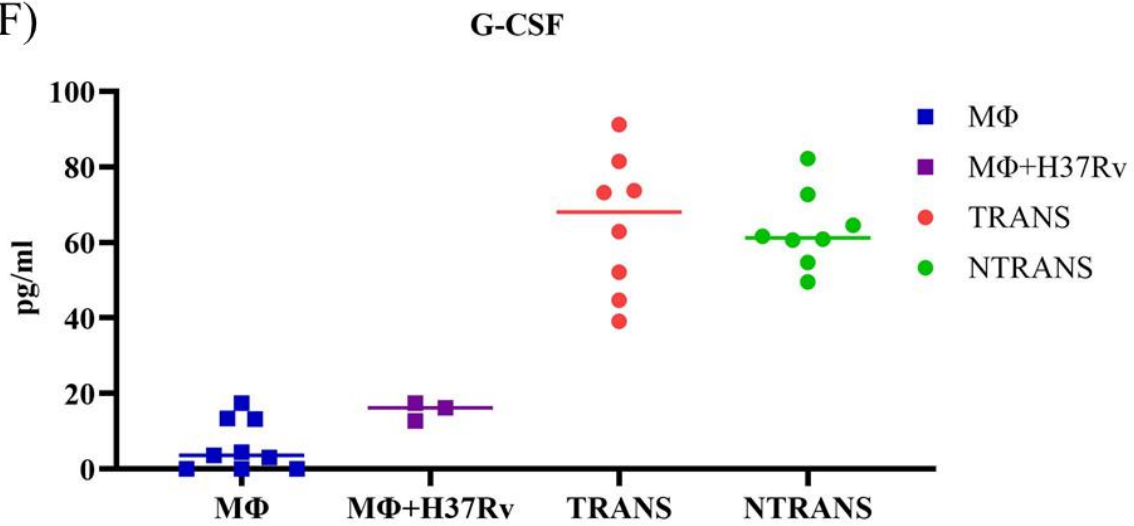
D)

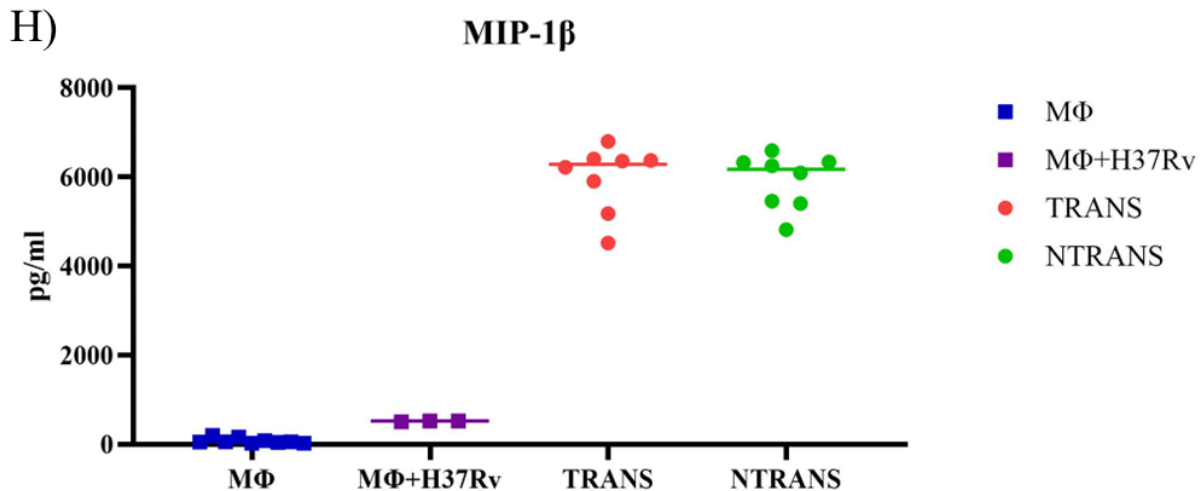
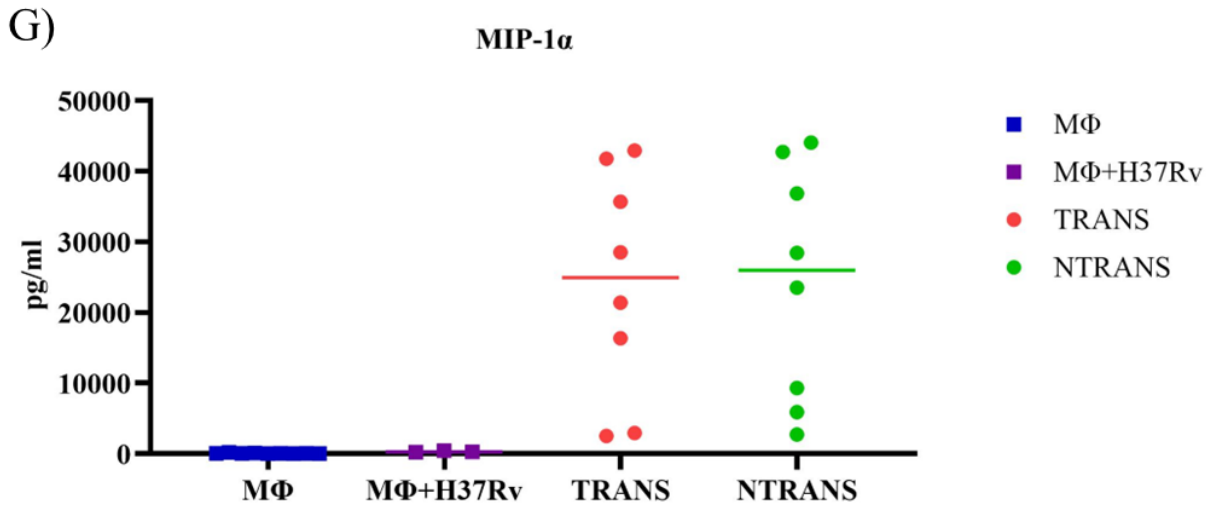


E)



F)





Ryc. 5.11. Uwalnianie cytokin IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, TNF α , G-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β (pg/ml) przez makrofagi niezakażone (oznaczone jako MΦ – na kolor grantaowy), makrofagi zakażone szczepem referencyjnym H37Rv (oznaczone jako MΦ+H37Rv – na kolor fioletowy) makrofagi zakażone szczepami wysokotransmisyjnymi (oznaczone jako TRANS – na kolor czerwony) oraz niskotransmisyjnymi *M. tuberculosis* (oznaczone jako NTRANS – na kolor zielony).

5.9. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie całkowitego RNA wybranych szczepów z grup prątków wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych.

Zbadano ekspresję genów trzech najczęściej izolowanych szczepów wysokotransmisyjnych (G149, G151, L139) w porównaniu do ich niskotransmisyjnych odpowiedników (2904_NT, 8069_NT, 5764_NT) (Tabela 5.3.). Metodologię przeprowadzanego eksperymentu opisano w podrozdziałach 4.6, 4.7 oraz 4.10 rozdziału Metody. Hodowle bakteryjne prowadzono na podłożu płynnym Middlebrook 7H9 suplementowanym OADC z dodatkiem Tween 80 (podłożu bogatym, suplementowanym OADC) oraz w drugim wariancie na podłożu płynnym Middlebrook 7H9 z dodatkiem 0,01% cholesterolu oraz 0,01% tyloxapolu (podłożu minimalne). Hodowle prowadzono do osiągnięcia gęstości optycznej OD=0,6-0,8. Hodowle wirowano a z otrzymanych osadów uzyskiwano całkowity RNA z użyciem Tri-zolu. Następnie sprawdzano czystość RNA i przygotowywano biblioteki do sekwencjonowania wysokoprzepustowego z użyciem zestawu TruePrep DNA Library Prep Kit V2 674 for Illumina (Vazyme Biotech). Próbkę sekwencjonowano przy użyciu urządzenia NextSeq 500 dzięki uprzejmości Pracowni Biobank Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Tabela 5.3. Szczepy wybrane do wysokoprzepustowego sekwencjonowania całkowitego RNA.

Szczep wysokotransmisyjny	Para niskotransmisyjna
G149	2904_NT
G151	8069_NT
L139	5764_NT

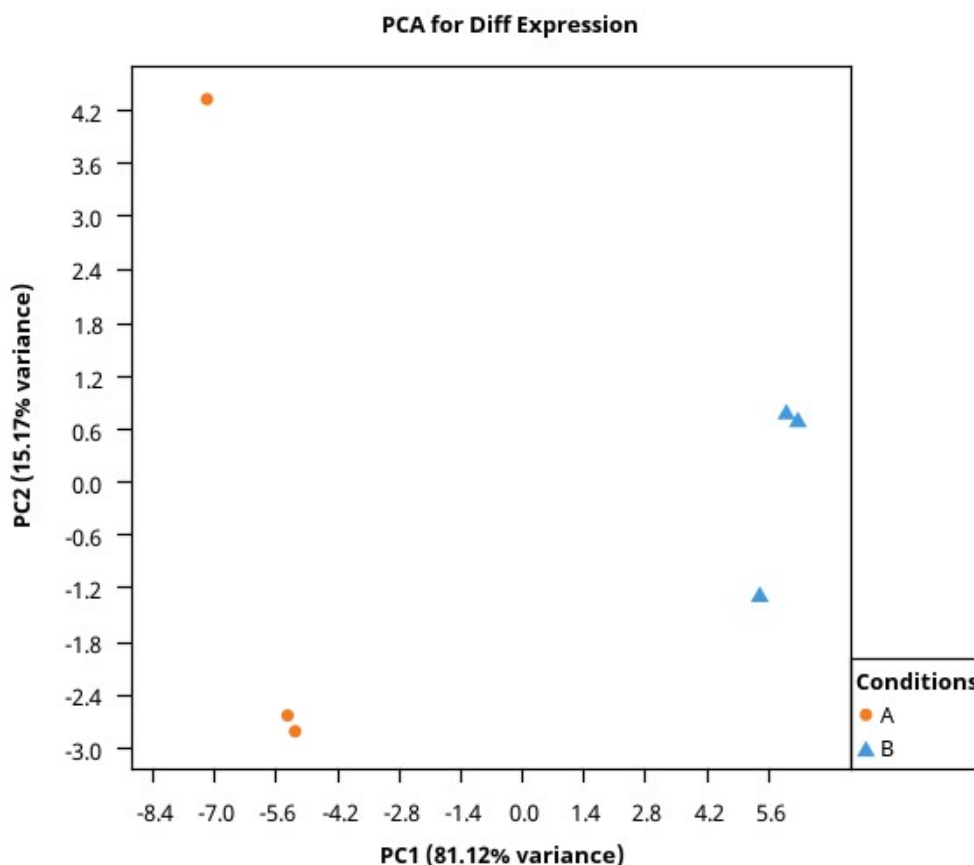
Otrzymane wyniki sekwencjonowania poddawano obróbce w oprogramowaniu Geneious Prime. Mediana odczytów na próbkę wyniosła 49 557 867 (IQR 60 315 974 – 45 241 248). Odczyty zmapowano do genomu referencyjnego szczepu H37Rv. Mediana zmapowanych odczytów wyniosła 37 450 129 (IQR 47 367 249 – 33 447 927). Stosunkowo niska liczba zmapowanych sekwencji wynika z użycia do analizy szczepów klinicznych, które różnią się

na poziomie sekwencji DNA od referencyjnego szczepu H37Rv. Jednakże mając na uwadze, że zalecane wartości odczytów wynoszą 5-10 mln na genom bakteryjny (Azenta Life Sciences 2023), dla wszystkich próbek osiągnięto wystarczającą ilość odczytów.

Tabela 5.4. Odczytane sekwencje nukleotydowe w wyniku wysokoprzepustowego sekwencjonowania całkowitego RNA oraz procent ich zmapowania do transkryptomu referencyjnego.

Szczep	G149	2904_NT	G151	8069_NT	L139	5764_NT
Wzrost na podłożu płynnym 7H9/OADC+Tween						
Odczyty powtórzenie 1	47424806	60934426	54742658	47735574	43089176	49828640
Zmapowane odczyty powtórzenie 1	37343659	49794938	43481677	35954051	32896337	42099503
% zmapowania powtórzenie 1	79%	82%	79%	75%	76%	84%
Odczyty powtórzenie 2	47286972	64171396	63847746	56507306	45062564	62794926
Zmapowane odczyty powtórzenie 2	38576039	53800470	50453429	43205720	33342630	52547165
% zmapowania powtórzenie 2	82%	84%	79%	76%	74%	84%
Odczyty powtórzenie 3	59682146	65664654	63576054	58393230	47671566	55489560
Zmapowane odczyty powtórzenie 3	48662439	54825709	49269567	36791049	37556599	38954989
% zmapowania powtórzenie 3	82%	83%	77%	63%	79%	70%
Wzrost na podłożu płynnym 7H9/cholesterol+tyloxapol						
Odczyty powtórzenie 1	49287094	53528554	65102224	46530652	45777298	51269404
Zmapowane odczyty powtórzenie 1	32101102	36166014	50120205	33953860	35206135	38795808
% zmapowania powtórzenie 1	65%	65%	77%	73%	77%	76%
Odczyty powtórzenie 2	80436290	60434644	8913482	37368404	46412178	38595934
Zmapowane odczyty powtórzenie 2	53150019	41233731	6820811	28330297	33763817	29226575
% zmapowania powtórzenie 2	66%	68%	77%	76%	73%	76%
Odczyty powtórzenie 3	45014430	59959962	7817854	37273328	46343098	38707288
Zmapowane odczyty powtórzenie 3	35052537	40370508	5903025	27640547	35012574	29791354
% zmapowania powtórzenie 3	78%	67%	76%	74%	76%	77%

Wykonano analizę głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA) dla poszczególnych par szczepów w warunkach wzrostu na podłożach płynnym 7H9 suplementowanym OADC oraz Tween 80 lub 7H9 suplementowanym cholesterolem oraz tyloxapolem. Analiza PCA danych zgromadzonych w wyniku RNAseq pokazuje grupowanie próbek według badanej grup. Mediana pierwszej składowej głównej (PC1) wyniosła 76,26% (IRQ 79,15 - 69,78) całkowitej wariancji dla wszystkich badanych układów, co oznacza, że w poszczególnych zestawach danych PCA1 nie była niższa niż 57%. Jeśli chodzi o PC2, mediana wyniosła 16,40% całkowitej wariancji (IRQ 25,60 - 13,91).



Ryc. 5.11. Analiza głównych składowych pary szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych G151 i 8069_NT rosnących na podłożu płynnym 7H9 z dodatkiem OADC oraz Tween 80. Na wykresie każdy punkt odpowiada jednemu powtórzeniu szczepu G151 zaznaczonych kolorem pomarańczowym oraz 8069_NT kolorem niebieskim.

Zbadano ekspresję genów w szczepach wysokotransmisyjnych w porównaniu do ich niskotransmisyjnych odpowiedników (Tabela 5.5.). Dla porównywanych układów 3 par

szczepów mediana dla 8 genów podlegało zwiększonej ekspresji (5-13), a dla 11 zmniejszonej ekspresji (9-13). Nie zaobserwowano powtarzającego się wzoru zmiany ekspresji genów dla badanych układów, czyli dla trzech kompletów szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych zidentyfikowano inne geny ze zmienioną ekspresją. Dla porównywanych układów, wiele genów miało zmienioną ekspresję równoległe na podłożu bogatym i z cholesterolem. Potwierdza to staranność wykonania przeprowadzonych badań. Wiarygodności wynikom dodaje fakt, że często geny podlegały zmienionej ekspresji całymi operonami. Niektóre z wyłonionych genów, *mce2A/R*, *mmp19* i *esxL* kodują białka powierzchniowe o potencjalnej roli w wirulencji *M. tuberculosis*. Geny *metH* i *prpC* oraz *prpD* kodują białka zaangażowane są w metabolizm witaminy B12 i metabolizm cholesterolu, co potencjalnie mogłoby wpływać na adaptację prątka do przeżywania w organizmie gospodarza.

Tabela 5.5. Geny o zmienionej ekspresji dla porównywanych 3 par szczepów z grup wysokotransmisyjnej i niskotransmisyjnej.

Gen	Produkt genu	Poziom zmiany log2 ratio	Różnica ekspresji log p-value	Poziom zmiany log2 ratio	Różnica ekspresji log p-value
L149 i 2904_NT					
Podłoże bogate					
Rv3767c	S-adenosylmethionine-dependent methyltr:	-7,01	1,39E-124	-6,79	2,50E-91
Rv3768	hypothetical protein CDS	-6,92	7,71E-95	-5,78	2,21E-66
Rv3769	hypothetical protein CDS			-6,74	3,75E-129
Rv0279c	PE PGRS4 CDS	-5,98	4,22E-285	-6,44	1,13E-264
Rv1802	PPE30 CDS	-3,87	4,57E-79	-3,72	1,54E-43
Rv3429	PPE59 CDS	-2,93	7,40E-38	-3,51	7,89E-82
Rv3879c	espK CDS			-2,63	1,20E-43
Rv2360c	hypothetical protein CDS	-2,45	9,26E-29		
Rv2339	mmpL9 CDS	-2,01	8,28E-17		
Rv1680	hypothetical protein CDS			-2,52	1,40E-29
Rv1681	moeX CDS	-2,11	6,47E-25		
Rv2124c	meth CDS			-2,29	5,46E-53
Rv3706c	hypothetical protein CDS			-2,16	8,73E-16
Rv1679	fadE16 CDS			-2,12	3,84E-20
Rv1678	integral membrane protein CDS			-2,10	6,23E-19
Rv0278c	PE-PGRS family protein PE PGRS3 CDS			-2,08	3,46E-27
Rv1870c	hypothetical protein CDS			2,12	5,61E-25
Rv3115	transposase CDS	2,10	1,13E-18		
Rv1047	transposase CDS	2,11	3,64E-19		
Rv3023c	transposase CDS	2,12	2,75E-19		
Rv1198	esxL CDS	2,15	4,73E-23		
Rv2512c	insertion sequence element IS1081 transpoc	2,15	1,07E-21	2,14	2,36E-35
Rv3388	PE PGRS52 CDS	2,16	2,76E-41		
Rv1199c	insertion sequence element IS1081 transpoc	2,25	9,07E-23		
Rv1361c	PPE19 CDS	2,33	2,56E-37		
Rv1196	PPE18 CDS	2,47	1,38E-38		
Rv3425	PPE57 CDS	2,63	8,69E-53	2,75	2,59E-40
Rv0780	purC CDS	2,64	5,22E-19	4,14	2,60E-130
Rv3514	PE PGRS57 CDS	4,17	3,23E-72		
Rv1052	hypothetical protein CDS	4,94	8,13E-113		

Gen	Produkt genu	Poziom zmiany log2 ratio	Różnica ekspresji log p value	Poziom zmiany log2 ratio	Różnica ekspresji log p-value
L151 i 8096_NT					
Podłoże bogate					
Rv3324c	moaC3 CDS	-6,71	3,31E-274	-7,0672366	4,42E-205
Rv1429	hypothetical protein CDS	-6,40	→0	-5,6152224	1,87E-233
Rv0587	yrbE2A CDS	-3,56	3,60E-196	-2,6713951	7,11E-78
Rv0586	mce2R CDS	-3,53	2,29E-126	-2,2801136	1,67E-28
Rv3323c	moaX CDS	-3,31	1,31E-150	-4,0997132	2,90E-168
Rv2012	hypothetical protein CDS	-3,08	7,80E-51	-3,0266689	1,16E-33
Rv0589	mce2A CDS	-3,03	1,28E-151	-2,5461013	1,61E-51
Rv0588	hypothetical protein CDS	-2,96	3,35E-97	-2,5129749	1,57E-53
Rv3322c	methytransferase CDS	-2,87	1,83E-82		
Rv2919c	glnB CDS	-2,56	4,93E-93	-2,0178392	2,26E-41
Rv2918c	glnD CDS	-2,06	3,46E-59		
Rv2818c	CRISPR-associated protein Csm6 CDS			-2,2842803	2,31E-24
Rv3125c	PPE49 CDS	2,22	1,34E-65		
Rv3397c	phyA CDS	2,28	2,84E-55	2,6588559	1,93E-27
Rv1484	inhA CDS	2,32	6,55E-97	2,4260645	5,00E-114
Rv1483	fabG1 CDS	2,44	1,81E-156	2,5307373	2,46E-68
Rv3685c	cyp137 CDS	3,75	4,80E-178	3,7569751	8,69E-98
Rv0279c	PE PGRS4 CDS	3,82	→0	3,9395579	1,98E-168
Rv1995	hypothetical protein CDS	3,97	3,94E-231	3,2221029	7,72E-80
Rv1999c	transporter CDS	5,44	→0	4,9684222	2,17E-136
Rv3686c	hypothetical protein CDS	8,28	→0	7,0241254	NA

Gen	Produkt genu	Poziom zmiany log2 ratio	Różnica ekspresji log p value	Poziom zmiany log2 ratio	Różnica ekspresji log p-value
L139 i 5764_NT					
Podłoże bogate					
Rv2816c	CRISPR-associated endoribonuclease Cas2 CDS	-8,02	1,85E-157	-5,29	3,54E-68
Rv2817c	CRISPR-associated endonuclease Cas1 C	-4,57	3,15E-28	-5,74	4,36E-89
Rv2818c	CRISPR-associated protein Csm6 CDS	-3,84	8,85E-240	-2,68	3,23E-13
Rv0549c	vapC3 CDS	-3,49	6,20E-200	-3,53	3,74E-92
Rv0550c	vapB3 CDS	-3,11	1,35E-110	-3,64	1,56E-106
Rv1535	hypothetical protein CDS	-3,10	2,49E-34		
Rv1188	proline dehydrogenase CDS	-2,77	4,45E-44		
Rv1189	sigI CDS			-2,19	1,11E-38
Rv1545	hypothetical protein CDS			-2,14	1,06E-17
Rv2058c	rpmB2 CDS			-2,06	3,37E-11
Rv2057c	rpmG1 CDS	-2,75	5,40E-14		
Rv1131	prpC CDS	-2,69	1,63E-26		
Rv3743c	ctpJ CDS	-2,57	1,24E-47	-2,34	1,69E-43
Rv0280	PPE3 CDS	-2,56	3,06E-16		
Rv1130	prpD CDS	-2,43	4,31E-52		
Rv0106	hypothetical protein CDS	-2,30	3,06E-23		
Rv1190	hypothetical protein CDS			-2,37	2,02E-29
Rv3758c	proV CDS	2,00	9,85E-17		
Rv3161c	dioxygenase CDS	2,02	3,00E-18	2,16	6,89E-24
Rv1715	fadB3 CDS	2,04	2,83E-23		
Rv3095	HTH-type transcriptional regulator CDS	2,04	2,71E-35		
Rv2521	bcp CDS	2,18	1,00E-16		
Rv3252c	alkB CDS	2,19	1,29E-13	2,01	4,05E-18
Rv1716	hypothetical protein CDS	2,19	2,15E-19		
Rv3160c	TetR family transcriptional regulator CDS	2,54	1,37E-38		
Rv3770c	hypothetical protein CDS	2,65	4,64E-34		
Rv1216c	integral membrane protein CDS	3,01	5,04E-30		
Rv1217c	tetronasin ABC transporter integral membi	3,09	1,33E-41		
Rv1219c	transcriptional regulator CDS	3,15	5,81E-89		
Rv3092c	integral membrane protein CDS	3,83	3,73E-81		
Rv1218c	tetronasin ABC transporter ATP-binding f			2,67	4,88E-39
Rv1714	oxidoreductase CDS			2,70	2,38E-48
Rv0736	rslA CDS			2,83	5,80E-71
Rv3179	hypothetical protein CDS			2,02	1,22E-39
Rv0738	hypothetical protein CDS	4,55	2,15E-119		
Rv3094c	hypothetical protein CDS	4,61	8,63E-66		
Rv3093c	oxidoreductase CDS				

6. Dyskusja

Gruźlica pozostaje jedną z najbardziej śmiertelnych chorób zakaźnych na świecie, pomimo ogromnych postępów w diagnostyce medycznej, opracowywaniu strategii leczenia i globalnej polityce organów zdrowia publicznego. Każdego roku miliony ludzi zapadają na tę chorobę, a liczba zgonów wynosi około miliona, przy czym w 2022 roku zmarło 1,3 miliona osób, a w roku 2021 i 2020 1,4 miliona. Wysokie wskaźniki śmiertelności są tym bardziej niepokojące, że skuteczność leczenia gruźlicy jest obecnie wysoka – 85% pacjentów poddanych terapii zostaje wyleczonych (Global Tuberculosis Report 2023). Walka z gruźlicą jest jednym z kluczowych wyzwań stojących przed globalną polityką zdrowia publicznego (Chakaya et al., 2021). Narzędzia, którymi dysponujemy to m.in. aktywne wykrywanie nowych przypadków, dochodzenie epidemiologiczne wśród potencjalnych kontaktów, szybkie wprowadzanie terapii zgodnych z wytycznymi WHO oraz poprawa standardu życia i warunków socjoekonomicznych jako czynnika mającego bezpośredni wpływ na status immunologiczny potencjalnych gospodarzy. Dodatkowo, aby skutecznie przeciwdziałać gruźlicy, niezbędne jest dogłębne zrozumienie jej epidemiologii, w tym mechanizmów rozprzestrzeniania się prątków gruźlicy. Na ich zdolność do szerzenia się w populacji ludzkiej wpływa wiele czynników, które znacząco utrudniają kontrolę tej choroby jako globalnego zagrożenia. Należą do nich czynniki środowiskowe, cechy gospodarza oraz specyfika samych prątków, która poddana została analizie w niniejszej pracy. Głębokie zrozumienie epidemiologii gruźlicy daje szansę na identyfikację konkretnych problemów aktualnej globalnej polityki zdrowia publicznego i znalezienie rozwiązań, co w konsekwencji może przyczynić się do ograniczenia rozprzestrzeniania się gruźlicy. Wśród czynników bakteryjnych wpływających na poziom transmisji prątków należy zwrócić uwagę na:

- Zmienność genetyczną szczepów *M. tuberculosis*, np. szczepy z rodziny Beijing, szczególnie kłady L2.3.4, L2.3.6, wykazują wyższą zakaźność w porównaniu z innymi szczepami (Zhu et al. 2023).
- Czynniki wirulencji, np. specyficzne *loci* genetyczne i czynniki zjadliwości, takie jak system sekrecji typu VII ESX-1, odgrywają kluczową rolę w zdolności bakterii do unikania układu odpornościowego gospodarza i zwiększania zakaźności (Holt et al. 2018).

- Oporność na leki, np. szczepy MDR mogą mieć obniżoną żywotność, ale pewne mutacje kompensacyjne mogą złagodzić ten efekt i utrzymać, a nawet zwiększyć zakaźność (Merker et al. 2022).

Niemniej jednak również odpowiedź organizmu człowieka jako gospodarza ma znaczenie dla rozprzestrzeniania się prątków. Pośród wielu czynników gospodarza, szczególnie odpowiedź immunologiczna, w tym produkcja cytokin, takich jak IL-1 β , oraz aktywacja makrofagów alweolarnych może wpływać na wczesne rozprzestrzenianie się *M. tuberculosis* i jego późniejszą transmisję (Lovey et al. 2022). Ponadto koinfekcje i choroby współistniejące takie jak zakażenie HIV, niedożywienie oraz inne niedobory odporności, mogą zwiększać podatność na gruźlicę oraz zwiększać prawdopodobieństwo jej transmisji (Bastos et al. 2018).

Dodatkowo czynniki środowiskowe mogące wywierać wpływ na poziom transmisji gruźlicy to:

- Transmisja jest bardziej prawdopodobna w zatłoczonych i słabo wentylowanych środowiskach, gdzie unoszące się w powietrzu prątki z większym prawdopodobieństwem będą wdychane przez nowych gospodarzy (Turner et al. 2017).
- Uwalnianie żywych prątków w postaci aerozoli, głównie podczas kaszlu, jest kluczowym etapem w procesie transmisji. Zdolność prątków do przetrwania w środowisku zewnętrznym i inhalacji przez nowego gospodarza jest zależna od warunków otoczenia oraz cech szczepu *M. tuberculosis*, choćby nasłonecznienia (promieniowania UV), wilgotności (wysychania) i zdolności prątków do naprawy uszkodzeń DNA (Gorna, Bowater, and Dziadek 2010).

W niniejszej pracy doktorskiej zbadano czy wpływ genotypu i fenotypu grup szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych prątków gruźlicy, może mieć wpływ na ich rozprzestrzenianie się. Hipotezę tę weryfikowano poprzez szereg eksperymentów molekularnych i fenotypowych mających wyłonić różnice między szczepami wysokotransmisyjnymi oraz niskotransmisyjnymi.

Do zdefiniowania grup szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych w kolekcji Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie użyto danych epidemiologicznych oraz wstępnego genotypowania metodami spoligotyping i MIRU-VNTR oraz wytycznych opisanych szczegółowo w rozdziale Metody 4.2. Następnie przynależność szczepów do obu grup potwierdzono

przy pomocy znacznie dokładniejszych danych uzyskanych w wyniku wysokoprzepustowego sekwencjonowania genomowego DNA oraz klastrowania szczepów. Dodatkowo wyróżniono pary szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych na podstawie ich przynależności do określonych rodzin linii filogenetycznych w celu uniknięcia wyłonienia mutacji charakterystycznych dla danych linii filogenetycznych. Spośród 326 zsekwencjonowanych szczepów, wyłoniono 23 klastry, jednak liczbę par zmniejszono do 13 ze względu na ich wysoką lekooporność bądź trudności w hodowli laboratoryjnej. Porównanie grup szczepów wykonano przy pomocy testu Fishera, który umożliwia identyfikację istotnych statystycznie różnic w częstości pojawiania się poszczególnych mutacji, mogących mieć powiązanie ze zmniejszonym lub zwiększonym rozprzestrzenianiem się prątków. W teście tym nie wyłoniono różnic między dwoma grupami szczepów, a więc wynik ten sugeruje brak występowania, w sposób istotny statystycznie, mutacji mogących wpływać na transmisyjność prątków.

Podobne badania przeprowadzono na 1445 szczepach wyizolowanych w Chinach. Dodatkowo do badań autorzy użyli 12 132 izolaty, których sekwencje DNA dostępne są w bazie NCBI. Powyższe badania pozwoliły na wytypowanie mutacji (SNP) charakterystycznych dla szczepów zgrupowanych w dużych klastrach, jak i mutacji opisanych już w bazach danych. Autorzy tej pracy sugerują, że istotne znaczenie w procesie transmisji gruźlicy mogą mieć mutacje w systemach toksyna-antytoksyna (Hou et al. 2024). Ta sama grupa badawcza, zaobserwowała korelację pomiędzy klastrowaniem, a obecnością mutacji w genach związanych z metabolizmem żelaza. Wyłoniono niesynonimiczne pojedyncze mutacje w genie *Rv0197* (G344T, T2247G), które powiązane były ze zwiększoną transmisyjnością szczepów, przy czym mutacja T2247G dominowała w liniach filogenetycznych 2 i 4 (Li et al. 2024). Istotnym ograniczeniem w obu wyżej wspomnianych pracach badawczych jest użycie sekwencji szczepów dostępnych w internetowych bazach danych, ponieważ brak jest kontroli nad pochodzeniem izolatów w grupach badanych. Niejednokrotnie sekwencjonowane i publikowane są izolaty pochodzące od tego samego pacjenta, nie można zatem z całą pewnością mówić o pojawiających klastrach (Merker et al. 2022; Pérez-Lago et al. 2014). Jednakże nawet badania bazujące na szczepach wyizolowanych spośród krajowych kolekcji szczepów często są sprzeczne. Przykładowo w badaniach Nebenzahl-Guimaraes et al. porównujących szczepy wysokotransmisyjne i niskotransmisyjne wykorzystano szczepy pochodzące z Holandii i wyróżniono istotne różnice w genach oraz regionach między genowych takich jak *espE*, *PE-PGRS56*, *rv0197*, *Rv2813–2814c* oraz *Rv2815–2816c*. Produkt

genu *espE* został zidentyfikowany jako jeden z niezbędnych czynników wirulencji prątków gruźlicy. Dodatkowo szczepy z wariantami w genie *espE*, jak i regionie Rv2813–2814 korelowały ze wzmożoną produkcją cytokin przez makrofagi (Nebenzahl-Guimaraes et al. 2017). Jednakże zidentyfikowane w tych badaniach geny nie pokrywają z tymi wyłonionymi w badaniu Sobkowiak et al., gdzie zwrócono uwagę na sześć genów: *PPE54*, *accD2*, *PE_PGRS62*, *rplI*, *rv3751* and *rv2077c* (Sobkowiak et al. 2020). Dodatkowym czynnikiem wpływającym na niezgodności w publikowanych wynikach prac różnych grup może być fakt, że niektóre izolaty są nadreprezentowane w bazach genomów zw. np. na lekooporność.

Najbardziej rozpowszechnionymi na świecie są szczepy linii filogenetycznej L2 i L4 (Wiens et al. 2018), co potwierdzono w badaniach wstępnych do pracy doktorskiej. Podczas badań dokonano analizy literatury typu „*systematic review*”, w której analizowano dostępne w bazach PubMed oraz Web of Science dane na temat wybuchów epidemicznych potwierdzonych w wyniku analizy danych pochodzących z WGS. W wyniku tej analizy potwierdziliśmy, że wybuchy epidemiczne gruźlicy występują na całym świecie i zazwyczaj powodowane są szczepami z rodziny L2 oraz L4 (Żukowska et al. 2023), co potwierdzają również badania innych grup naukowych (Li et al. 2024). Jest to zgodne ze zjawiskiem sympatryczności, na które obecnie zwraca uwagę praca m.in. Gröschel et al. Jest to występowania powiązań między populacjami zasiedlającymi te same obszary geograficzne, czym tłumaczone jest dlaczego niektóre linie filogenetyczne są szeroko rozpowszechnione (L4, L2) a niektóre nie (L5, L6) (Gröschel et al. 2024).

Jednym z głównych ograniczeń niniejszej pracy doktorskiej jest liczba zanalizowanych szczepów oraz ich ograniczenie geograficzne. W badaniach asocjacyjnych potrzebna jest duża ilość danych genomowych. Liczba szczepów wykorzystanych do niniejszych badań, zarówno wielkość kolekcji jak i możliwości finansowe ich zsekwencjonowania, okazały się niewystarczające, by wykazać istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami. Ponadto nie możemy wykluczyć, że przynajmniej część ze szczepów zaklasyfikowanych przez nas jako niskotransmisyjne faktycznie ulega standardowej lub zwiększonej transmisji, lecz nowe zakażenie nie objawiło się w postaci aktywnej gruźlicy w badaniach w skali naszego kraju. Nie możemy wykluczyć, że szczepy, u których obserwujemy niską transmisję w skali naszego kraju, podlegają standardowej lub zwiększonej transmisji w skali świata. Dodatkowo, gruźlica jest chorobą, której

obraz etiologiczny jest skomplikowany, znacznie utrudniający dokładne umiejscowienie zakażenia w czasie (Mathema et al. 2017), a nawet identyfikację samego zakażenia. Jednym z poważnych problemów, które stoją przed programami kontrolującymi gruźlicę jest trudność w jej wykrywaniu. Według danych statystycznych zebranych w Globalnym Raportcie WHO w 2012 aż 1/3 przypadków gruźlicy pozostała niewykryta (Sulis et al. 2014). Poszukiwane są wciąż nowe efektywne metody wykrywania oraz diagnostyki pacjentów asymptomatycznych, jak i tych posiadających utajoną formę gruźlicy (Escalante et al. 2023; Scriba et al. 2021). Ponadto, kilka grup badawczych zajmujących się epidemiologią prątków gruźlicy zauważyło istnienie zróżnicowanych populacji prątków u tych samych pacjentów (S raphin et al. 2019; Trauner et al. 2017). Nie da się również pomin c tutaj czynników środowiskowych i socjoekonomicznych jako mających znaczny wpływ na rozprzestrzenianie się prątków, co może znacznie utrudniać wy lonienie prawdziwej grupy szczepów wysokotransmisyjnych.

Badania nad powiązaniem genotypu prątków z poziomem ich transmisyjności są istotne. Niemniej jednak aby wartościowe były takie analizy, konieczne jest wprowadzenie systemu nadzoru gruźlicy opartego o metody takie jak sekwencjonowanie WGS w skali  wiatowej. Taki system pozwoli w przysz lci na precyzyjne zidentyfikowanie grup izolatów o niskiej i wysokiej transmisyjności w oparciu o dane wystarczające do przeprowadzenia rzetelnych analiz statystycznych. Odmienne wyniki równych grup badawczych mogą po części wynikać z tego, że stosuj  one własne, wypracowane w laboratoriach, specyficzne metody analizy, które nie zawsze są możliwe do zaadaptowania i mogą prowadzić do rozbieżności w ocenie transmisyjności (Walter et al., 2020). Dlatego kluczowe jest opracowanie efektywnych, powtarzalnych oraz łatwych w użytkowaniu zestawów procedur bioinformatycznych do badania transmisji prątków z wykorzystaniem chociażby systemu cgMLST, omówionego szerzej we wstępie niniejszej pracy (Kohl et al. 2014b).

W drugim etapie pracy poszukiwano r znic fenotypowych między grupami szczepów wysokotransmisyjnych a niskotransmisyjnych poprzez porównywanie ich poziomu dostosowania, immunologiczną odpowiedź gospodarza oraz reakcj  na środowisko życia. Pary szczepów z grupy wysoko- i niskotransmisyjnych początkowo porównywano w celu wy lonienia r znic w ich przystosowaniu do wzrostu w warunkach laboratoryjnych. Tradycyjnie do tego typu eksperymentów używa się pomiarów gęstości optycznej przy długości fali równej OD₆₀₀, jednakże

prątki gruźlicy są organizmami, które mają tendencje do formowania struktur kilku bakterii złączonych razem (ang. *clump*), co może zaburzać prawidłowy odczyt (von Groll et al. 2010). Stąd też jako kontrolę eksperymentu użyto najdokładniejszej metody szacowania wzrostu bakterii na podłożu stałym (CFU) (Ryc. 5.3.) – dzięki temu można ocenić, ile bakterii zdolnych do utworzenia kolonii jest obecnych w badanym materiale. Niestety szczepy kliniczne prątków gruźlicy są organizmami, które nie są zdolne do wzrostu na stałych podłożach laboratoryjnych (Mishra and Saito 2022) i taki problem napotkaliśmy również w naszych badaniach w przypadku 7 klinicznych szczepów *M. tuberculosis*. Jest to zgodne z odkryciami grupy Gordhan et al., która postuluje istnienie prątków o odmiennych wymogach hodowlanych (ang. *differentially culturable tubercle bacteria, DCTB*), czyli takich, które nie posiadają umiejętności wzrostu na podłożu stałym a rosną jedynie na podłożach płynnych. Podobne zjawisko obserwowano dla innych gatunków bakterii (Oliver 2010). Z tego względu, dla szczepów niezdolnych do tworzenia kolonii na podłożu 7H10 z dodatkiem suplementu OADC, liczbę bakterii określano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, dzięki której udało się potwierdzić obecność bakterii w zawieszynie hodowlanej, jednakże nie można wykluczyć, że upośledzony wzrost tych szczepów zaburzył analizę danych. Analizując kinetykę wzrostu szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych nie stwierdzono istotnych różnic między oboma grupami szczepów (Ryc. 5.2), jednakże zaobserwowano różnice w zmienności w populacji prątków. Z kolei w badaniach zespołu Verma et al., gdzie autorzy rozdzielali szczepy na wysokotransmisyjne i niskotransmisyjne na podstawie rozprzestrzeniania się ich w miejscach zamieszkania i pozytywnej próby tuberkulinowej. Autorzy zauważyli, że w modelu mysim szczepy niskotransmisyjne rosną w większej liczbie niż szczepy wysokotransmisyjne (Verma et al. 2019). Z kolei w pracy zespołu Moopanar et al. zauważono różnicę między wzrostem szczepu referencyjnego H37Rv a szczepem linii L2 Beijing na podłożu płynnym 7H9 z dodatkiem suplementu OADC (Moopanar et al. 2022), jednak należy zauważyć, że pod uwagę brani byli jedynie pojedynczy przedstawiciele danych linii filogenetycznych. Interesującego odkrycia dokonała również grupa Gordhan et al., która zauważyła, że najwyższy udział DCTB występował w płwocinie pacjentów zakażonych prątkami linii 2 Beijing (Gordhan et al. 2024). Nie wiadomo jednak, dlaczego to głównie prątki linii Beijing miałyby przyjmować ten odmienny stan wzrostu i czy jest to bezpośrednio związane z ich transmisyjnością, co byłoby interesującym zagadnieniem do dalszych badań.

Kolejnym elementem prowadzonych badań była analiza mechanizmów dostosowania prątków gruźlicy, które to umożliwiają zrozumienie dynamiki interakcji między populacjami prątków opornych i wrażliwych na antybiotyki oraz oceny, czy jedna z tych populacji może zdominować drugą (Dye and Espinal 2001). W literaturze naukowej opisano, że pojawienie się mutacji prowadzących do powstania oporności, szczególnie w przypadku ryfampicyny, ma wpływ na wzrost prątków gruźlicy *in vitro* (Gagneux 2009). Teorię tę potwierdzają również badania Burgos et al., w których zauważono, że szczepy odporne mają obniżoną zdolność do transmisji (Burgos et al. 2003). Tłumacząc wyniki badania autorzy zwracają uwagę na zjawisko poziomu dostosowania prątków oraz występowania mutacji kompensacyjnych, które niwelują negatywny wpływ mutacji powodujących lekooporność na przeżywalność oraz rozprzestrzenianie się (Alame Emane et al. 2021). Niektóre grupy badawcze postulują, że część szczepów lekoopornych jest zdolna do znacznej ekspansji klonanej np. kład Beijing W148 (Merker et al. 2022). Wskazywałoby to, że część szczepów MDR lub XDR cechuje się zwiększoną transmisyjnością i zdolnością rozprzestrzeniania się w populacjach (Kendall, Fofana, and Dowdy 2015a). Z tym punktem widzenia zgadzają się również autorzy badania nad transmisyjnością szczepów w Chinach, którzy zauważyli, że szczepy odporne na ryfampicynę występują bardzo często w klastrach niedawnej transmisji (He et al. 2022). W analizie *systematic review* przeprowadzonej przez naszą grupę odkryliśmy, że szczepy lekooporne są raportowane częściej w badaniach dotyczących wybuchów epidemiologicznych (52%) niż w badaniach dotyczących ogólnej populacji prątków (Żukowska et al. 2023). W niniejszej pracy w celu analizy czy szczepy z grup wysokotransmisyjnej i niskotransmisyjnej posiadają różnice w poziomie względnego (Ryc. 5.7.) lub bezwzględnego (Ryc. 5.8.) dostosowania zastosowano testy kompetycji. Nie udało się zaobserwować istotnych statystycznie różnic między oboma grupami szczepów.

Jednym z procesów występujących w przebiegu gruźlicy jest tworzenie się ziarniniaka, czyli struktury, w której aktywowane makrofagi i inne komórki odpowiedzi immunologicznej otaczają miejsca zakażenia (Parrish, Dick, and Bishai 1998). Prątki zmuszone są do adaptacji do nieprzyjaznego środowiska ziarniniaków, gdzie panuje ograniczony dostęp do związków odżywczych jak i niski poziom tlenu. Jedną z kluczowych umiejętności radzenia sobie w środowisku ograniczonego tlenu jest możliwość przejścia w stan utajony. Dzięki temu prątki mogą przetrwać w niekorzystnych warunkach przez bardzo długi czas i reaktywować zakażenie dopiero, gdy np. odporność gospodarza znacznie się osłabi (Rustad et al. 2008), co może pośrednio

przyczynić się do ich transmisji. W niniejszej pracy zbadano czy grupy prątków wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych różnią się kinetyką wzrostu w warunkach ograniczonego dostępu do tlenu. W tym celu szczepy obu grup hodowano w warunkach z obniżoną zawartością tlenu przez 30 dni a następnie w warunkach normalnych, aby ocenić, ile prątków przeżyło te warunki oraz jak szybko szczepy te są w stanie przestawić swój metabolizm. Nie znaleziono istotnie statystycznych różnic między badanymi grupami szczepów (Ryc. 5.5.), jednakże odnotowano różnice charakterystyczne dla poszczególnych izolatów (Ryc. 5.4.). Należy zauważyć pewne ograniczenia niniejszych badań. Po pierwsze, modele *in vitro* nie są w stanie oddać, jakie dokładnie zmiany w metabolizmie prątków zachodzą podczas infekcji i czy osiągnięto stan uśpienia prątków (Del Portillo et al. 2019), jednakże w niniejszej pracy nie przewidziano modelu *in vivo*. Eksperymenty *in vivo* planowane były w przypadku uzyskania interesujących wyników w badaniach z modelami opartymi o hodowlę bakterii. Dla osiągnięcia stanu latencji w naszej pracy zaadaptowano model Wayne'a, który jest najczęściej stosowanym modelem pozwalającym na uzyskanie przez prątki stanu latencji poprzez stopniowe obniżanie dostępu do tlenu podczas wzrostu (Wayne and Hayes 1996).

Prątki gruźlicy są heterotrofami zdolnymi do wykorzystywania różnych źródeł węgla (Chang and Guan 2021). Ma to ogromne znaczenie w trakcie rozwoju zakażenia w ziarniniakach, kiedy to metabolizm prątków gruźlicy w dużej mierze przestawiony zostaje na pozyskiwanie węgla z kwasów tłuszczowych oraz cholesterolu. Jest to związane ze środowiskiem życia i indukowaną infekcją przekształceniem zakażonych makrofagów w makrofagi piankowe posiadające ciała lipidowe, w których zanurzone są komórki bakterii (Huang, Nazarova, and Russell 2019; Moopanar et al. 2022). Są również dowody, że enzymy wykorzystywane w metabolizmie cholesterolu przez prątki mają również wpływ np. na płynność błon komórkowych komórek gospodarza (Neuvonen et al. 2014). Aby zbadać, jaki wpływ na transmisyjność prątków ma wykorzystywanie cholesterolu jako źródła węgla, dokonano analizy transkryptomu prątków z grup wysokotransmisyjnej i niskotransmisyjnej, które hodowano na podłożu minimalnym z dodatkiem cholesterolu. W analizie tej wyłoniliśmy odmienne zestawy genów ulegających nadekspresji jak i zmniejszonej ekspresji dla różnych szczepów, przez co nie dało się wyłonić wspólnego profilu genów o zmienionej ekspresji dla grupy szczepów wysokotransmisyjnych ani niskotransmisyjnych (Tabela 5.5.). Jednakże wśród genów o zmienionym poziomie ekspresji znajdowały się między innymi *mce2A/R*, *mmp19* i *esxL*,

które powiązane są z zakaźnością prątków gruźlicy (Melly and Purdy 2019; Pattanaik et al. 2021; Singh et al. 2016), oraz geny *metH* i *prpC* oraz *prpD* kodujące białka związane z adaptacją metabolizmu prątków do środowiska życia w gospodarzu (Masiewicz et al. 2012; Warner et al. 2007). Praca grupy Del Portillo et al., badającej transkryptom prątków w kontekście stanu utajenia, zauważa, że cholesterol może mieć mocniejszy związek z fazą aktywnego wzrostu (Del Portillo et al. 2019). Z kolei wyniki grupy Moopanar et al. sugerują, że istnieją różnice w profilach metabolizmu cholesterolu szczepów klinicznych prątków gruźlicy (Moopanar et al. 2022), jednakże grupa nie badała ich powiązania z transmisyjnością. Należy również nadmienić, że procesy metaboliczne umożliwiające przeżycie w warunkach hipoksji, jak i wykorzystywania odmiennych źródeł węgla są ze sobą powiązane (Del Portillo et al. 2019), co również może zaburzać wyniki naszej analizy.

Ostatnim punktem badań fenotypowych było zbadanie wczesnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Podczas rozwoju zakażenia prątki gruźlicy są pochłaniane przez makrofagi płucne, gdzie prątki uruchamiają mechanizmy pozwalające im na uniknięcie degradacji lizosomalnej. Makrofagi płucne są pierwszymi komórkami pojawiającymi się w miejscu zakażenia a ich rola w jego opanowaniu jest ogromna (Upadhyay et al. 2018). Stąd też, aby ocenić efektywnie odpowiedź gospodarza, analizowano przeżywalność jak i pochłanianie szczepów grup wysokotransmisyjnej i niskotransmisyjnej prątków gruźlicy przez makrofagi, jak i produkcję cytokin przez te komórki. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy wskazują, że istnieje niewielka, aczkolwiek statystycznie znamienne różnica w pochłanianiu wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych szczepów prątków gruźlicy (Ryc. 5.9), jednak nie przekłada się to na ich przeżywalność (Ryc. 5.10.) w makrofagach ani na ich aktywność funkcjonalną w postaci indukcji sekrecji określonego panelu cytokin (Ryc. 5.11.). Stąd też można wyciągnąć wniosek, że obie te grupy szczepów powodują uruchomienie odmiennych ścieżek metabolicznych, których jednak nie badano w ramach niniejszej pracy. Wyniki te częściowo pokrywają się z badaniami zespołu Reiling et al., w których m.in. zaobserwowano brak różnic w pochłanianiu szczepów sublinii Haarlem oraz Beijing. Z kolei wyłoniono różnice w przeżywalności między subliniami Haarlem oraz Beijing a EAI. Profil indukcji cytokin prozapalnych TNF- α , IL-12p40, IL-1 β oraz IL-6 był z kolei odmienny dla szczepów Beijing (niski poziom odpowiedzi immunologicznej) i Haarlem (wysoki poziom odpowiedzi). W naszym badaniu zauważyliśmy niskie pobudzenie cytokin TNF- α , IL-12p40, ale wysoki IL-1 β . Należy jednak zaznaczyć, że modelem w pracy Reiling et al. były

makrofagi pochodzące z ludzkich monocytów (ang. *human monocyte-derived macrophages*, hMDM), jak i że szczepy nie były rozdzielone według ich transmisyjności (Reiling et al. 2013). W badaniu Lovey et al., gdzie autorzy z kolei rozdzielali szczepy na wysokotransmisyjne i niskotransmisyjne odkryto, że szczepy wysokotransmisyjne powodują nadekspresję genów *TNF*, *IL1A*, *IL1B* w makrofagach alweolarnych (Lovey et al. 2022).

Uzyskane w toku pracy wyniki badań wskazują, że szczepy zakwalifikowane do grup wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych nie wykazują statystycznie istotnych różnic w przeprowadzonych analizach fenotypowych. Podobnie jak w przypadku badań genotypowych, podejrzewamy, że wielkość kolekcji okazała się niewystarczająca, by wykazać istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami. Ponadto nie możemy wykluczyć, że przynajmniej część ze szczepów zaklasyfikowanych przez nas jako niskotransmisyjne faktycznie ulega standardowej lub zwiększonej transmisji, lecz nowe zakażenie nie objawiło się w postaci aktywnej gruźlicy w badaniach w skali naszego kraju. Wyniki uzyskane w toku niniejszej pracy są sprzeczne z badaniami grupy Verma et al., w których stwierdzono powiązanie między fenotypem a transmisyjnością klinicznych szczepów prątków gruźlicy. W badaniach tych szczepy wysoko i niskotransmisyjne zostały podzielone na grupy na podstawie poziomu wzbudzenia podczas próby tuberkulinowej u domowników osoby zakażonej zgodnie z modelem opisanym w pracy Jones-López et al., 2014 (Jones-López et al. 2014). Badania te wykazały, że szczepy wysokotransmisyjne i niskotransmisyjne różnią się pod względem liczby prątków w płucach, odpowiedzi immunologicznej oraz typu powstających ziarniniaków. Szczepy, które podlegały wysokiej transmisji wśród domowników wywoływały łagodną postać choroby u myszy. Należy jednak podkreślić, że analiza została wykonana na trzech szczepach wysoko i trzech szczepach nisko transmisyjnych wybranych z kolekcji 124 szczepów (Verma et al. 2019). Warto podkreślić, że badania te przeprowadzono *in vivo* na modelu mysim, co sugeruje, że wykorzystanie modeli zwierzęcych może odgrywać istotną rolę w badaniach nad transmisyjnością.

Podsumowując, nasze badania wykazały brak istotnych różnic między grupami szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych na poziomie zarówno genotypowym, jak i fenotypowym, co może wskazywać, że zasadniczym czynnikiem związanym z transmisyjnością są czynniki związane z gospodarzem. Do tych czynników należą np. status immunologiczny, występowanie chorób współistniejących (infekcja wirusem HIV, cukrzyca),

kondycja mikrobioty, czynniki genetyczne oraz inne np. palenie tytoniu (Bastos et al. 2018). Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie dla dalszego rozwoju strategii kontroli gruźlicy w populacji. Przeprowadzone analizy przyczyniają się do lepszego zrozumienia, jak należy odpowiednio oceniać transmisyjność klinicznych szczepów prątków gruźlicy, podkreślając rolę WGS w badaniach nad transmisyjnością. Wprowadzenie systemu nadzoru gruźlicy opartego o WGS w skali globalnej umożliwi prawidłowe wskazanie grup izolatów nisko- i wysokotransmisyjnych w ilościach wystarczających na przeprowadzenie wiarygodnych badań.

7. Wnioski

- Głównym czynnikiem wpływającym na transmisję prątków gruźlicy w obrębie tej samej linii filogenetycznej są czynniki zależne od gospodarza oraz czynniki socjoekonomiczne.
- Zróżnicowanie genetyczne i związane z tym zróżnicowanie fenotypowe samych patogenów ma ograniczone znaczenie dla zdolności szczepów klinicznych *M. tuberculosis* do transmisji.

8. Streszczenie

Głębokie zrozumienie mechanizmów rozprzestrzeniania się gruźlicy jest kluczowe w walce z tą chorobą i niezbędne do opracowania skutecznych globalnych systemów kontroli przez organy zdrowia publicznego. Wiadomo, że na transmisyjność gruźlicy wpływa szereg złożonych i wzajemnie powiązanych czynników, co znacznie utrudnia projektowanie i analizę badań nad jej rozprzestrzenianiem. Czynniki te obejmują warunki środowiskowe, takie jak temperatura i wilgotność powietrza, czynniki socjoekonomiczne, m.in. gęstość zaludnienia czy szybki i efektywny dostęp do opieki zdrowotnej, a także czynniki związane z gospodarzem, wpływające na jego status immunologiczny, takie jak współistniejące choroby (np. cukrzyca) oraz niedożywienie. Ważne są również cechy patogenu, takie jak jego zakaźność czy zdolność do wywoływania reakcji prozapalnej oraz podłoże genetyczne (pochodzenie z konkretnej linii filogenetycznej). Istotnym aspektem pozostaje fakt, że czynniki patogenne wpływające na transmisyjność gruźlicy nie zostały jeszcze w pełni zidentyfikowane i nadal stanowią przedmiot intensywnych badań, ze względu na sprzeczne wyniki różnych analiz.

Celem niniejszej pracy było określenie zmienności genotypowej i fenotypowej prątków gruźlicy o wysokiej oraz niskiej transmisyjności w Polsce.

W pierwszym etapie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wytypowano szczepy o wysokiej i niskiej transmisyjności z kolekcji Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie na podstawie ich spoligotypu. Wyłoniono 347 kandydatów na szczepy o wysokiej transmisyjności oraz 44 kandydatów na szczepy o niskiej transmisyjności. Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie całego genomu (WGS) tych szczepów, co umożliwiło analizę asocjacyjną i przyporządkowanie ich do odpowiednich klastrow na podstawie różnic w polimorfizmach pojedynczych nukleotydów (SNP). Początkowo wyodrębniono 23 klastry szczepów o wysokiej transmisyjności, jednak liczba ta została zredukowana do 13 z powodu trudności z prowadzeniem badań *in vitro*. Szczepy, które nie grupowały się w klastry, uznano za niskotransmisyjne. Kryteria doboru szczepów omówiono szczegółowo w rozdziale 4. Metody. W kolejnym kroku, do wybranych szczepów wysokotransmisyjnych dopasowano szczepy niskotransmisyjne, co umożliwiło dalsze porównawcze analizy fenotypowe. Pary szczepów pochodziły z tych samych linii i sublinii filogenetycznych oraz nie mogły różnić się o więcej niż określoną liczbę SNP.

Wszystkie analizowane szczepy pochodziły z filogenetycznej linii 4, z wyjątkiem jednego szczepu należącego do linii 2. Analiza statystyczna wariantów między szczepami o wysokiej i niskiej transmisyjności nie wykazała istotnych różnic między tymi dwiema grupami.

W kolejnych etapach pracy skupiono się na badaniach fenotypowych, mających na celu identyfikację różnic w kinetyce wzrostu między szczepami wysokotransmisyjnymi i niskotransmisyjnymi. W pierwszej kolejności przeprowadzono hodowle w standardowych warunkach laboratoryjnych na podłożu płynnym 7H9 z dodatkiem OADC, a kontrolnie szczepy wysiewano na podłoże stałe 7H10 z dodatkiem OADC, aby ocenić ich żywotność. Wyniki tej analizy nie wykazały różnic w kinetyce wzrostu między obiema grupami szczepów. Następnie przeprowadzono eksperyment w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, naśladując *in vitro* środowisko, w jakim prątki mogą znajdować się w płucach gospodarza. Szczepy hodowano przez 30 dni w podłożu beztlenowym, po czym reaktywowano je na podłożu płynnym, aby ocenić ich zdolność do wzrostu po okresie uśpienia. Ta analiza również nie wykazała istotnych różnic między szczepami o wysokiej i niskiej transmisyjności.

W następnym etapie uzyskano rekombinowane szczepy wysokotransmisyjne, wykorzystując plazmid pMV306attP_{ercc3_Mtb-gfp}, zawierający gen reporterowy *gfp*, kodujący białko zielonej fluorescencji pod kontrolą silnego promotora genu *ercc3*. Umożliwiło to efektywną identyfikację rekombinantów przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Uzyskano 9 rekombinowanych szczepów wysokotransmisyjnych. Plazmid pMV306attP_{ercc3_Mtb-gfp} zawierał również gen oporności na kanamycynę, co umożliwiło selekcję szczepów na podłożu 7H10 suplementowanym OADC z dodatkiem kanamycyny. Następnie przeprowadzono testy kompetycji w celu określenia poziomu dostosowania względnego z jednoczesną hodowlą szczepów wysokotransmisyjnych (rekombinowanych) i niskotransmisyjnych oraz testy kompetycji w celu określenia poziomu dostosowania bezwzględnego, gdzie hodowano szczepy wysokotransmisyjne lub niskotransmisyjne ze szczepem kontrolnym *M. tuberculosis* Δ katG. Analiza tych eksperymentów nie wykazała istotnych statystycznie różnic między szczepami o wysokiej i niskiej transmisyjności.

Następnie określano poziom wewnątrzkomórkowego pochłaniania wybranych szczepów *M. tuberculosis* przez makrofagi. Ta analiza wykazała statystycznie istotne różnice między

badanymi grupami szczepów – szczepy wysokotransmisyjne były pochłaniane w większym stopniu niż szczepy niskotransmisyjne. Przeprowadzono także eksperyment dotyczący przeżywalności prątków wewnątrz makrofagów. Analiza przeżywalności prątków nie wykazała statystycznie istotnych różnic między szczepami wysokotransmisyjnymi a niskotransmisyjnymi.

Ostatnim etapem pracy była analiza transkryptomu grup szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych. Hodowle bakteryjne prowadzono w podłożu płynnym bogatym 7H9 suplementowanym OADC, oraz w drugim wariantcie, z dodatkiem 0,01% cholesterolu oraz 0,01% tyloxapolu. Nie zaobserwowano dla szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych konkretnych genów wspólnych, które podlegałyby zmienionej ekspresji.

Uzyskane wyniki pokazują, że badanie transmisyjności jest złożonym procesem. Między badanymi grupami szczepów nie wykazano istotnych statystycznie różnic genotypowych ani fenotypowych.

9. Abstract

The understanding of the mechanisms behind the spread of tuberculosis is crucial in combating this disease and essential for developing effective global control policies by the public health sector. It is known that the transmissibility of tuberculosis is influenced by a range of complex and interrelated factors, which significantly complicates the design and analysis of studies on its spread. These factors include environmental conditions such as temperature and humidity, socioeconomic factors like population density or quick and efficient access to healthcare, as well as host-related factors affecting immune status, such as coexisting diseases (e.g., diabetes) and malnutrition. Important pathogen characteristics, such as its infectiousness or ability to induce a pro-inflammatory response, as well as its genetic background (originating from a particular phylogenetic lineage), are also crucial. However, pathogen-related factors influencing tuberculosis transmissibility have not yet been fully identified and remain the subject of intensive research, due to conflicting results from various studies.

This study aimed to determine the genotypic and phenotypic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains with high and low transmissibility in Poland.

In the first stage of this project, high or low transmission strains were selected from the collection of the National Tuberculosis and Lung Diseases Research Institute in Warsaw based on their spoligotype. A total of 347 candidates for high-transmissibility strains and 44 candidates for low-transmissibility strains were selected. Whole-genome sequencing (WGS) of these strains was then performed, allowing for association analysis and assignment to appropriate clusters based on single nucleotide polymorphism (SNP) differences. Initially, 23 clusters of high-transmissibility strains were identified; however, this number was reduced to 13 due to difficulties in conducting *in vitro* studies. Strains that did not group into clusters were classified as low transmission. The criteria for strain selection are discussed in detail in Chapter 4: Methods. In the next step, selected high transmission strains were matched with low transmission strains, enabling further comparative phenotypic analyses. The strain pairs originated from the same phylogenetic lines and sublines and could not differ by more than a specified number of SNPs. All analyzed strains belonged to phylogenetic lineage 4, except for one strain from lineage 2. Statistical analysis of the variants between the high and low transmission strains did not show significant differences between these two groups.

In subsequent stages of the study, phenotypic research focused on identifying differences in growth kinetics between high or low transmission strains. Initially, cultures were conducted under standard laboratory conditions in liquid 7H9 media with OADC supplement, and for control, the strains were also plated on solid 7H10 media with OADC to assess their viability. The results of this analysis did not show differences in growth kinetics between the two groups of strains. Next, an experiment was conducted under limited oxygen conditions, mimicking the *in vitro* environment that the bacteria may encounter in the host's lungs. The strains were cultured for 30 days in an anaerobic medium and then reactivated in a liquid medium to assess their ability to grow after a dormancy period. This analysis also did not reveal significant differences between the high and low transmission strains.

In the next stage, recombinant high-transmissibility strains were obtained using the plasmid pMV306attP_{ercc3}*Mtb-gfp*, containing the *gfp* reporter gene, encoding the green fluorescent protein under the control of a strong promoter from the *ercc3* gene. This allowed for the efficient identification of recombinants using fluorescence microscopy. A total of 9 recombinant high transmission strains were obtained. The plasmid also contained a gene for kanamycin resistance, which allowed for the selection of strains on the 7H10 media supplemented with OADC and kanamycin. Competition assays were then conducted to determine the level of relative fitness by co-culturing high-transmissibility (recombinant) and low transmission strains, as well as absolute fitness assays, where high or low transmission strains were co-cultured with the control strain *M. tuberculosis* Δ katG. The analysis of these experiments did not reveal statistically significant differences between the high and low-transmissibility strains.

Next, the level of intracellular uptake of selected *M. tuberculosis* strains by macrophages was assessed. This analysis showed statistically significant differences between the studied groups of strains – high transmission strains were taken up to a greater extent than low transmission strains. An experiment on the survival of bacteria inside macrophages was also conducted. The survival analysis did not reveal statistically significant differences between the high and low-transmission strains.

The final stage of the study involved transcriptome analysis of the high and low transmission strains. Bacterial cultures were grown in rich liquid 7H9 media supplemented with OADC, and in a second variant, in only liquid 7H9 media with the addition of 0.01%

cholesterol and 0.01% tyloxapol. No specific shared genes with altered expression were observed for either high or low transmission strains.

The obtained results demonstrate that studying transmissibility is a complex process. No statistically significant genotypic or phenotypic differences were observed between the studied groups of strains.

10. Literatura

- de Abreu e Silva, Mirna, Cláudia Di Lorenzo Oliveira, Rafael Gonçalves Teixeira Neto, and Paulo Augusto Camargos. 2016. 'Spatial Distribution of Tuberculosis from 2002 to 2012 in a Midsize City in Brazil'. *BMC Public Health* 16(1):912. doi: 10.1186/s12889-016-3575-y.
- Achtman, Mark. 2008. 'Evolution, Population Structure, and Phylogeography of Genetically Monomorphic Bacterial Pathogens'. *Annual Review of Microbiology* 62:53–70. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162832.
- Acosta, Lisiane Morelia Weide, and Sérgio Luiz Bassanesi. 2014. 'The Porto Alegre Paradox: Social Determinants and Tuberculosis Incidence'. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 17:88–101. doi: 10.1590/1809-4503201400060008.
- Alame Emame, Amel Kevin, Xujun Guo, Howard E. Takiff, and Shengyuan Liu. 2021. 'Drug Resistance, Fitness and Compensatory Mutations in Mycobacterium Tuberculosis'. *Tuberculosis* 129:102091. doi: 10.1016/j.tube.2021.102091.
- Alaridah, Nader, Erika Tång Hallbäck, Jeanette Tångrot, Niclas Winqvist, Erik Sturegård, Kerstin Florén-Johansson, Bodil Jönsson, Erik Tenland, Christina Welinder-Olsson, Patrik Medstrand, Bertil Kaijser, and Gabriela Godaly. 2019. 'Transmission Dynamics Study of Tuberculosis Isolates with Whole Genome Sequencing in Southern Sweden.' *Scientific Reports* 9(1):4931. doi: 10.1038/s41598-019-39971-z.
- Alderwick, Luke J., James Harrison, Georgina S. Lloyd, and Helen L. Birch. 2015. 'The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(8):a021113. doi: 10.1101/cshperspect.a021113.
- Alisjahbana, B., R. van Crevel, E. Sahiratmadja, M. den Heijer, A. Maya, E. Istriana, H. Danusantoso, T. H. M. Ottenhoff, R. H. H. Nelwan, and J. W. M. van der Meer. 2006. 'Diabetes Mellitus Is Strongly Associated with Tuberculosis in Indonesia'. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 10(6):696–700.
- Allix-Béguec, Caroline, Maryse Fauville-Dufaux, and Philip Supply. 2008. 'Three-Year Population-Based Evaluation of Standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing of Mycobacterium Tuberculosis.' *Journal of Clinical Microbiology* 46(4):1398–1406. doi: 10.1128/JCM.02089-07.
- Ansarin, Kh., L. Sahebi, Y. Aftabi, M. Khalili, and M. Seyyedi. 2020. 'Comparing IS6110-RFLP, PGRS-RFLP and IS6110-Mtb1/Mtb2 PCR Methods for Genotyping of Mycobacterium Tuberculosis Isolates'. *Journal of Applied Microbiology* 129(4):1062–70. doi: 10.1111/jam.14676.
- Asadi, Leyla, Matthew Croxen, Courtney Heffernan, Mannat Dhillon, Catherine Paulsen, Mary Lou Egedahl, Greg Tyrrell, Alexander Doroshenko, and Richard Long. 2022. 'How

- Much Do Smear-Negative Patients Really Contribute to Tuberculosis Transmissions? Re-Examining an Old Question with New Tools'. *eClinicalMedicine* 43. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101250.
- Awomoyi, Agnes A., Manhattan Charurat, Arnaud Marchant, E. Nancy Miller, Jenefer M. Blackwell, Keith P. W. J. McAdam, and Melanie J. Newport. 2005. 'Polymorphism in IL1B: IL1B-511 Association with Tuberculosis and Decreased Lipopolysaccharide-Induced IL-1beta in IFN-Gamma Primed Ex-Vivo Whole Blood Assay'. *Journal of Endotoxin Research* 11(5):281–86. doi: 10.1179/096805105X58706.
- Azenta Life Sciences. 2023. 'RNA-Seq FAQ'. Retrieved 16 September 2024 (<https://web.genewiz.com/rna-seq-faq>).
- Bakuła, Zofia, Mateusz Marczak, Agata Bluszcz, Małgorzata Proboszcz, Justyna Kościuch, Rafał Krenke, Petras Stakėnas, Igor Mokrousov, and Tomasz Jagielski. 2023. 'Phylogenetic Relationships of Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Poland: The Emergence of Beijing Genotype among Multidrug-Resistant Cases'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 13.
- Bastos, Helder Novais, Nuno S. Osório, Sebastien Gagneux, Iñaki Comas, and Margarida Saraiva. 2018. 'The Troika Host–Pathogen–Extrinsic Factors in Tuberculosis: Modulating Inflammation and Clinical Outcomes'. *Frontiers in Immunology* 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01948.
- Bespiatykh, D., J. Bespiatykh, I. Mokrousov, and E. Shitikov. 2021. 'A Comprehensive Map of Mycobacterium Tuberculosis Complex Regions of Difference'. *mSphere* 6(4). doi: 10.1128/mSphere.00535-21.
- Boere, Tjarda M., Douwe H. Visser, A. Marceline van Furth, Paul Lips, and Frank G. J. Cobelens. 2017. 'Solar Ultraviolet B Exposure and Global Variation in Tuberculosis Incidence: An Ecological Analysis'. *European Respiratory Journal* 49(6). doi: 10.1183/13993003.01979-2016.
- Bottai, Daria, Wafa Frigui, Fadel Sayes, Mariagrazia Di Luca, Dalila Spadoni, Alexandre Pawlik, Marina Zoppo, Mickael Orgeur, Varun Khanna, David Hardy, Sophie Mangenot, Valerie Barbe, Claudine Medigue, Laurence Ma, Christiane Bouchier, Arianna Tavanti, Gerald Larrouy-Maumus, and Roland Brosch. 2020. 'TbD1 Deletion as a Driver of the Evolutionary Success of Modern Epidemic Mycobacterium Tuberculosis Lineages'. *Nature Communications* 11. doi: 10.1038/s41467-020-14508-5.
- Bucher, H. C., L. E. Griffith, G. H. Guyatt, P. Sudre, M. Naef, P. Sendi, and M. Battegay. 1999. 'Isoniazid Prophylaxis for Tuberculosis in HIV Infection: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials'. *AIDS (London, England)* 13(4):501–7. doi: 10.1097/00002030-199903110-00009.
- Burgos, Marcos, Kathryn DeRiemer, Peter M. Small, Philip C. Hopewell, and Charles L. Daley. 2003. 'Effect of Drug Resistance on the Generation of Secondary Cases of Tuberculosis'. *The Journal of Infectious Diseases* 188(12):1878–84. doi: 10.1086/379895.

- Bussi, Claudio, and Maximiliano G. Gutierrez. 2019. 'Mycobacterium Tuberculosis Infection of Host Cells in Space and Time'. *FEMS Microbiology Reviews* 43(4):341–61. doi: 10.1093/femsre/fuz006.
- Bustamante, Jacinta, Stéphanie Boisson-Dupuis, Laurent Abel, and Jean-Laurent Casanova. 2014. 'Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease: Genetic, Immunological, and Clinical Features of Inborn Errors of IFN- γ Immunity'. *Seminars in Immunology* 26(6):454–70. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.008.
- Cabibbe, Andrea Maurizio, Alberto Trovato, Maria Rosaria De Filippo, Arash Ghodousi, Laura Rindi, Carlo Garzelli, Simonetta Baretta, Guendalina Allodi, Roberta Mannino, Gian Maria Rossolini, Alessandro Bartoloni, Enrico Tortoli, and Daniela Maria Cirillo. 2018. 'Countrywide Implementation of Whole Genome Sequencing: An Opportunity to Improve Tuberculosis Management, Surveillance and Contact Tracing in Low Incidence Countries.' *The European Respiratory Journal* 51(6). doi: 10.1183/13993003.00387-2018.
- Casali, Nicola, Vladyslav Nikolayevskyy, Yanina Balabanova, Simon R. Harris, Olga Ignatyeva, Irina Kontsevaya, Jukka Corander, Josephine Bryant, Julian Parkhill, Sergey Nejentsev, Rolf D. Horstmann, Timothy Brown, and Francis Drobniowski. 2014. 'Evolution and Transmission of Drug-Resistant Tuberculosis in a Russian Population.' *Nature Genetics* 46(3):279–86. doi: 10.1038/ng.2878.
- Chang, Dorothy Pei Shan, and Xue Li Guan. 2021. 'Metabolic Versatility of Mycobacterium Tuberculosis during Infection and Dormancy'. *Metabolites* 11(2):88. doi: 10.3390/metabo11020088.
- Chiner-Oms, Álvaro, Mariana G. López, Miguel Moreno-Molina, Victoria Furió, and Iñaki Comas. 2022. 'Gene Evolutionary Trajectories in Mycobacterium Tuberculosis Reveal Temporal Signs of Selection'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(17):e2113600119. doi: 10.1073/pnas.2113600119.
- Christianson, Sara, Joyce Wolfe, Pamela Orr, James Karlowsky, Paul N. Levett, Greg B. Horsman, Louise Thibert, Patrick Tang, and Meenu K. Sharma. 2010. 'Evaluation of 24 Locus MIRU-VNTR Genotyping of Mycobacterium Tuberculosis Isolates in Canada.' *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 90(1):31–38. doi: 10.1016/j.tube.2009.12.003.
- Clark, Michael, Peter Riben, and Earl Nowgessic. 2002. 'The Association of Housing Density, Isolation and Tuberculosis in Canadian First Nations Communities'. *International Journal of Epidemiology* 31(5):940–45. doi: 10.1093/ije/31.5.940.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 1998.

- 'Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence'. *Nature* 393(6685):537–44. doi: 10.1038/31159.
- Coll, Francesc, Ruth McNerney, Mark D. Preston, José Afonso Guerra-Assunção, Andrew Warry, Grant Hill-Cawthorne, Kim Mallard, Mridul Nair, Anabela Miranda, Adriana Alves, João Perdigão, Miguel Viveiros, Isabel Portugal, Zahra Hasan, Rumina Hasan, Judith R. Glynn, Nigel Martin, Arnab Pain, and Taane G. Clark. 2015. 'Rapid Determination of Anti-Tuberculosis Drug Resistance from Whole-Genome Sequences'. *Genome Medicine* 7(1):51. doi: 10.1186/s13073-015-0164-0.
- Comas, Iñaki, Jaidip Chakravarti, Peter M. Small, James Galagan, Stefan Niemann, Kristin Kremer, Joel D. Ernst, and Sebastien Gagneux. 2010. 'Human T Cell Epitopes of Mycobacterium Tuberculosis Are Evolutionarily Hyperconserved'. *Nature Genetics* 42(6):498–503. doi: 10.1038/ng.590.
- Comas, Iñaki, Susanne Homolka, Stefan Niemann, and Sebastien Gagneux. 2009. 'Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Sequencing in Mycobacterium Tuberculosis Highlights the Limitations of Current Methodologies.' *PloS One* 4(11):e7815. doi: 10.1371/journal.pone.0007815.
- Connolly, Lynn E., Paul H. Edelstein, and Lalita Ramakrishnan. 2007. 'Why Is Long-Term Therapy Required to Cure Tuberculosis?' *PLoS Medicine* 4(3):e120. doi: 10.1371/journal.pmed.0040120.
- Corbett, Elizabeth L., Salome Charalambous, Vicky M. Moloji, Katherine Fielding, Alison D. Grant, Christopher Dye, Kevin M. De Cock, Richard J. Hayes, Brian G. Williams, and Gavin J. Churchyard. 2004. 'Human Immunodeficiency Virus and the Prevalence of Undiagnosed Tuberculosis in African Gold Miners'. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170(6):673–79. doi: 10.1164/rccm.200405-590OC.
- Corbett, Elizabeth L., Barbara Marston, Gavin J. Churchyard, and Kevin M. De Cock. 2006. 'Tuberculosis in Sub-Saharan Africa: Opportunities, Challenges, and Change in the Era of Antiretroviral Treatment'. *Lancet (London, England)* 367(9514):926–37. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68383-9.
- Coscolla, Mireia, and Sebastien Gagneux. 2014. 'Consequences of Genomic Diversity in Mycobacterium Tuberculosis'. *Seminars in Immunology* 26(6):431–44. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.012.
- Cowley, Donna, Dharendra Govender, Bradley February, Mary Wolfe, Lafras Steyn, Joanna Evans, Robert J. Wilkinson, and Mark P. Nicol. 2008. 'Recent and Rapid Emergence of W-Beijing Strains of Mycobacterium Tuberculosis in Cape Town, South Africa.' *Clin Infect Dis* 47(10):1252–59. doi: 10.1086/592575.
- Cronan, Mark R. 2022. 'In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses'. *Frontiers in Immunology* 13.

- CRyPTIC Consortium. 2018. 'DNA Sequencing Predicts 1st-Line Tuberculosis Drug Susceptibility Profiles'. *The New England Journal of Medicine* 379(15):1403. doi: 10.1056/NEJMoa1800474.
- Del Portillo, Patricia, Lázaro García-Morales, María Carmen Menéndez, Juan Manuel Anzola, Juan Germán Rodríguez, Addy Cecilia Helguera-Repetto, Miguel A. Ares, Rafael Prados-Rosales, Jorge A. Gonzalez-y-Merchand, and María Jesús García. 2019. 'Hypoxia Is Not a Main Stress When Mycobacterium Tuberculosis Is in a Dormancy-Like Long-Chain Fatty Acid Environment'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8. doi: 10.3389/fcimb.2018.00449.
- Derbyshire, Keith M., and Todd A. Gray. 2014. 'Distributive Conjugal Transfer: New Insights into Horizontal Gene Transfer and Genetic Exchange in Mycobacteria'. *Microbiology Spectrum* 2(1):04. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0022-2013.
- Dhar, Neeraj, John McKinney, and Giulia Manina. 2016. 'Phenotypic Heterogeneity in Mycobacterium Tuberculosis'. *Microbiology Spectrum* 4(6):4.6.10. doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0021-2016.
- Di Perri, G., A. Cazzadori, S. Vento, S. Bonora, M. Malena, L. Bontempini, M. Lanzafame, B. Allegranzi, and E. Concia. 1996. 'Comparative Histopathological Study of Pulmonary Tuberculosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected and Non-Infected Patients'. *Tubercle and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 77(3):244–49. doi: 10.1016/s0962-8479(96)90008-8.
- Doyle, Ronan M., Carrie Burgess, Rachel Williams, Rebecca Gorton, Helen Booth, James Brown, Josephine M. Bryant, Jackie Chan, Dean Creer, Jolyon Holdstock, Heinke Kunst, Stefan Lozewicz, Gareth Platt, Erika Yara Romero, Graham Speight, Simon Tiberi, Ibrahim Abubakar, Marc Lipman, Timothy D. McHugh, and Judith Breuer. 2018. 'Direct Whole-Genome Sequencing of Sputum Accurately Identifies Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Faster than MGIT Culture Sequencing'. *Journal of Clinical Microbiology* 56(8):e00666-18. doi: 10.1128/JCM.00666-18.
- Du, Duc Hong, Ronald B. Gekus, Yanlin Zhao, Luigi Ruffo Codecasa, Daniela Maria Cirillo, Reinout van Crevel, Dyshelly Nurkartika Pascapurnama, Lidya Chaidir, Stefan Niemann, Roland Diel, Shaheed Vally Omar, Louis Grandjean, Sakib Rokadiya, Arturo Torres Ortíz, Nguyễn Hữu Lân, Đặng Thị Minh Hà, E. Grace Smith, Esther Robinson, Martin Dedicat, Le Thanh Hoang Nhat, Guy E. Thwaites, Le Hong Van, Nguyen Thuy Thuong Thuong, and Timothy M. Walker. 2023. 'The Effect of M. Tuberculosis Lineage on Clinical Phenotype'. *PLOS Global Public Health* 3(12):e0001788. doi: 10.1371/journal.pgph.0001788.
- Dye, C., and M. A. Espinal. 2001. 'Will Tuberculosis Become Resistant to All Antibiotics?'. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 268(1462):45–52. doi: 10.1098/rspb.2000.1328.

- Dye, C., K. Lönnroth, E. Jaramillo, BG Williams, and M. Raviglione. 2009. 'Trends in Tuberculosis Incidence and Their Determinants in 134 Countries'. *Bulletin of the World Health Organization* 87(9):683–91. doi: 10.2471/BLT.08.058453.
- van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, and T. M. Shinnick. 1993. 'Strain Identification of Mycobacterium Tuberculosis by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology.' *Journal of Clinical Microbiology* 31(2):406–9.
- van Embden, J. D., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Jansen, B. A. van Der Zeijst, and L. M. Schouls. 2000. 'Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of Mycobacterium Tuberculosis Complex Bacteria.' *Journal of Bacteriology* 182(9):2393–2401. doi: 10.1128/jb.182.9.2393-2401.2000.
- Ernst, Joel D. 2012. 'The Immunological Life Cycle of Tuberculosis'. *Nature Reviews Immunology* 12(8):581–91. doi: 10.1038/nri3259.
- Escalante, P., M. R. Vadiyala, B. Pathakumari, P. K. Marty, V. P. Van Keulen, H. R. Hilgart, K. Meserve, E. S. Theel, T. Peikert, R. C. Bailey, and R. Laniado-Laborin. 2023. 'New Diagnostics for the Spectrum of Asymptomatic TB: From Infection to Subclinical Disease'. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 27(7):499–505. doi: 10.5588/ijtld.23.0032.
- Fabri, Mario, Steffen Stenger, Dong-Min Shin, Jae-Min Yuk, Philip T. Liu, Susan Realegeno, Hye-Mi Lee, Stephan R. Krutzik, Mirjam Schenk, Peter A. Sieling, Rosane Teles, Dennis Montoya, Shankar S. Iyer, Heiko Bruns, David M. Lewinsohn, Bruce W. Hollis, Martin Hewison, John S. Adams, Andreas Steinmeyer, Ulrich Zügel, Genhong Cheng, Eun-Kyeong Jo, Barry R. Bloom, and Robert L. Modlin. 2011. 'Vitamin D Is Required for IFN-Gamma-Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages'. *Science Translational Medicine* 3(104):104ra102. doi: 10.1126/scitranslmed.3003045.
- Fares, Auda. 2011. 'Seasonality of Tuberculosis'. *Journal of Global Infectious Diseases* 3(1):46–55. doi: 10.4103/0974-777X.77296.
- Feleke, Berhanu Elfu, Teferi Elfu Feleke, and Fantahun Biadlegne. 2019. 'Nutritional Status of Tuberculosis Patients, a Comparative Cross-Sectional Study'. *BMC Pulmonary Medicine* 19(1):182. doi: 10.1186/s12890-019-0953-0.
- Feng, Jia-Yih, Wei-Juin Su, Cheng-Chien Tsai, and Shi-Chuan Chang. 2008. 'Clinical Impact of Mycobacterium Tuberculosis W-Beijing Genotype Strain Infection on Aged Patients in Taiwan'. *Journal of Clinical Microbiology* 46(9):3127–29. doi: 10.1128/JCM.01132-08.
- Fennelly, Kevin P., Edward C. Jones-López, Irene Ayakaka, Soyeon Kim, Harriet Menyha, Bruce Kirenga, Christopher Muchwa, Moses Joloba, Scott Dryden-Peterson, Nancy Reilly, Alphonse Okwera, Alison M. Elliott, Peter G. Smith, Roy D. Mugerwa, Kathleen D. Eisenach, and Jerrold J. Ellner. 2012. 'Variability of Infectious Aerosols Produced during Coughing by Patients with Pulmonary Tuberculosis'. *American Journal of*

Respiratory and Critical Care Medicine 186(5):450–57. doi: 10.1164/rccm.201203-0444OC.

- Feuerriegel, Silke, Thomas A. Kohl, Christian Utpatel, Sönke Andres, Florian P. Maurer, Jan Heyckendorf, Agathe Jouet, Nelly Badalato, Lynda Foray, Rashidatu Fouad Kamara, Osman S. Conteh, Philip Supply, and Stefan Niemann. 2021. ‘Rapid Genomic First- and Second-Line Drug Resistance Prediction from Clinical Mycobacterium Tuberculosis Specimens Using Deeplex-MycTB’. *European Respiratory Journal* 57(1). doi: 10.1183/13993003.01796-2020.
- Ford, Christopher B., Rupal R. Shah, Midori Kato Maeda, Sebastien Gagneux, Megan B. Murray, Ted Cohen, James C. Johnston, Jennifer Gardy, Marc Lipsitch, and Sarah M. Fortune. 2013. ‘Mycobacterium Tuberculosis Mutation Rate Estimates from Different Lineages Predict Substantial Differences in the Emergence of Drug Resistant Tuberculosis’. *Nature Genetics* 45(7):784–90. doi: 10.1038/ng.2656.
- Fox, Gregory J., Simone E. Barry, Warwick J. Britton, and Guy B. Marks. 2013. ‘Contact Investigation for Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis’. *The European Respiratory Journal* 41(1):140–56. doi: 10.1183/09031936.00070812.
- Freschi, Luca, Roger Vargas, Ashaque Husain, S. M. Mostofa Kamal, Alena Skrahina, Sabira Tahseen, Nazir Ismail, Anna Barbova, Stefan Niemann, Daniela Maria Cirillo, Anna S. Dean, Matteo Zignol, and Maha Reda Farhat. 2021. ‘Population Structure, Biogeography and Transmissibility of Mycobacterium Tuberculosis’. *Nature Communications* 12(1):6099. doi: 10.1038/s41467-021-26248-1.
- Gagneux, S. 2009. ‘Fitness Cost of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis’. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 1:66–68. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02685.x.
- Gagneux, Sebastien. 2012. ‘Host–Pathogen Coevolution in Human Tuberculosis’. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1590):850–59. doi: 10.1098/rstb.2011.0316.
- Gagneux, Sebastien, Kathryn DeRiemer, Tran Van, Midori Kato-Maeda, Bouke C. de Jong, Sujatha Narayanan, Mark Nicol, Stefan Niemann, Kristin Kremer, M. Cristina Gutierrez, Markus Hilty, Philip C. Hopewell, and Peter M. Small. 2006. ‘Variable Host–Pathogen Compatibility in Mycobacterium Tuberculosis’. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8):2869–73. doi: 10.1073/pnas.0511240103.
- Gagneux, Sebastien, and Christoph Stritt. 2022. ‘How Do Monomorphic Bacteria Evolve? The *Mycobacterium Tuberculosis* Complex and the Awkward Population Genetics of Extreme Clonality’.

- García De Viedma, Darío, and Laura Pérez-Lago. 2018. 'The Evolution of Genotyping Strategies To Detect, Analyze, and Control Transmission of Tuberculosis.' *Microbiology Spectrum* 6(5). doi: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0002-2016.
- Gelaw, Yalemzewod Assefa, Weiwei Yu, Ricardo J. Soares Magalhães, Yibeltal Assefa, and Gail Williams. 2019. 'Effect of Temperature and Altitude Difference on Tuberculosis Notification: A Systematic Review'. *Journal of Global Infectious Diseases* 11(2):63–68. doi: 10.4103/jgid.jgid_95_18.
- Genestet, Charlotte, Elisabeth Hodille, Albin Bernard, Maxime Vallée, Gérard Lina, Adrien Le Meur, Guislaine Refrégier, and Oana Dumitrescu. 2022. 'Consistency of Mycobacterium Tuberculosis Complex Spoligotyping between the Membrane-Based Method and In Silico Approach'. *Microbiology Spectrum* 10(3):e00223-22. doi: 10.1128/spectrum.00223-22.
- Gerszten, Robert E., Eduardo A. Garcia-Zepeda, Yaw-Chyn Lim, Masayuki Yoshida, Han A. Ding, Michael A. Gimbrone, Andrew D. Luster, Francis W. Lusinskas, and Anthony Rosenzweig. 1999. 'MCP-1 and IL-8 Trigger Firm Adhesion of Monocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions'. *Nature* 398(6729):718–23. doi: 10.1038/19546.
- Githui, W. A., M. P. Hawken, E. S. Juma, P. Godfrey-Faussett, O. B. Swai, D. K. Kibuga, J. D. Porter, S. M. Wilson, and F. A. Drobniowski. 2000. 'Surveillance of Drug-Resistant Tuberculosis and Molecular Evaluation of Transmission of Resistant Strains in Refugee and Non-Refugee Populations in North-Eastern Kenya.' *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 4(10):947–55.
- Global tuberculosis report. 2022. 'Global Tuberculosis Report 2022'. Retrieved 9 May 2023 (<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240061729>).
- Global tuberculosis report 2020. n.d. 'Global Tuberculosis Report 2020'. Retrieved 11 September 2024 (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>).
- Gordhan, Bhavna Gowan, Kiyasha Padarath, Astika Sewcharran, Amanda McIvor, Michael S. VanNieuwenhze, Ziyaad Waja, Neil Martinson, and Baves Davandra Kana. 2024. 'Clinical Strains of Mycobacterium Tuberculosis Representing Different Genotype Families Exhibit Distinct Propensities to Adopt the Differentially Culturable State'. *Pathogens* 13(4):318. doi: 10.3390/pathogens13040318.
- Gorna, Alina E., Richard P. Bowater, and Jaroslaw Dziadek. 2010. 'DNA repair systems and the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: varying activities at different stages of infection'. *Clinical Science* 119(5):187–202. doi: 10.1042/CS20100041.
- von Groll, Andrea, Anandi Martin, Françoise Portaels, Pedro Eduardo Almeida da Silva, and Juan Carlos Palomino. 2010. 'Growth Kinetics of Mycobacterium Tuberculosis Measured by Quantitative Resazurin Reduction Assay: A Tool for Fitness Studies'. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(2):300–303. doi: 10.1590/S1517-83822010000200006.

- Gröschel, Matthias I., Francy J. Pérez-Llanos, Roland Diel, Roger Vargas, Vincent Escuyer, Kimberlee Musser, Lisa Trieu, Jeanne Sullivan Meissner, Jillian Knorr, Don Klinkenberg, Peter Kouw, Susanne Homolka, Wojciech Samek, Barun Mathema, Dick van Soolingen, Stefan Niemann, Shama Desai Ahuja, and Maha R. Farhat. 2024. 'Differential Rates of Mycobacterium Tuberculosis Transmission Associate with Host-Pathogen Sympatry'. *Nature Microbiology* 9(8):2113–27. doi: 10.1038/s41564-024-01758-y.
- Gruźlica i Choroby Układu Oddechowego w Polsce w 2022 r. and Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc. 2023. 'Gruźlica i Choroby Układu Oddechowego w Polsce w 2022 r. red. Maria Korzeniewska-Koseła. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2023'.
- Hargreaves, James R., Delia Boccia, Carlton A. Evans, Michelle Adato, Mark Petticrew, and John D. H. Porter. 2011. 'The Social Determinants of Tuberculosis: From Evidence to Action'. *American Journal of Public Health* 101(4):654–62. doi: 10.2105/AJPH.2010.199505.
- He, Guiqing, Yang Li, Xinchang Chen, Jiazhen Chen, and Wenhong Zhang. 2020. 'Prediction of Treatment Outcomes for Multidrug-Resistant Tuberculosis by Whole-Genome Sequencing'. *International Journal of Infectious Diseases* 96:68–72. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.043.
- He, Wencong, Yunhong Tan, Chunfa Liu, Yiting Wang, Ping He, Zexuan Song, Dongxin Liu, Huiwen Zheng, Aijing Ma, Bing Zhao, Xichao Ou, Hui Xia, Shengfen Wang, and Yanlin Zhao. 2022. 'Drug-Resistant Characteristics, Genetic Diversity, and Transmission Dynamics of Rifampicin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in Hunan, China, Revealed by Whole-Genome Sequencing'. *Microbiology Spectrum* 10(1):e01543-21. doi: 10.1128/spectrum.01543-21.
- Heyckendorf, Jan, Sönke Andres, Claudio U. Köser, Ioana D. Oлару, Thomas Schön, Erik Sturegård, Patrick Beckert, Viola Schleusener, Thomas A. Kohl, Doris Hillemann, Danesh Moradigaravand, Julian Parkhill, Sharon J. Peacock, Stefan Niemann, Christoph Lange, and Matthias Merker. 2018. 'What Is Resistance? Impact of Phenotypic versus Molecular Drug Resistance Testing on Therapy for Multi- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(2):10.1128/aac.01550-17. doi: 10.1128/aac.01550-17.
- Heyderman, R. S., M. Goyal, P. Roberts, S. Ushewokunze, S. Zizhou, B. G. Marshall, R. Makombe, J. D. Van Embden, P. R. Mason, and R. J. Shaw. 1998. 'Pulmonary Tuberculosis in Harare, Zimbabwe: Analysis by Spoligotyping.' *Thorax* 53(5):346–50. doi: 10.1136/thx.53.5.346.
- Holt, Kathryn E., Paul McAdam, Phan Vuong Khac Thai, Nguyen Thuy Thuong Thuong, Dang Thi Minh Ha, Nguyen Ngoc Lan, Nguyen Huu Lan, Nguyen Thi Quynh Nhu, Hoang Thanh Hai, Vu Thi Ngoc Ha, Guy Thwaites, David J. Edwards, Artika P. Nath, Kym Pham, David B. Ascher, Jeremy Farrar, Chiea Chuen Khor, Yik Ying Teo, Michael Inouye, Maxine Caws, and Sarah J. Dunstan. 2018. 'Frequent Transmission of the

- Mycobacterium Tuberculosis Beijing Lineage and Positive Selection for EsxW Beijing Variant in Vietnam'. *Nature Genetics* 50(6):849–56. doi: 10.1038/s41588-018-0117-9.
- Hou, Yawei, Yifan Li, Ningning Tao, Xianglong Kong, Yameng Li, Yao Liu, Huaichen Li, and Zhenguo Wang. 2024. 'Toxin-Antitoxin System Gene Mutations Driving Mycobacterium Tuberculosis Transmission Revealed by Whole Genome Sequencing'. *Frontiers in Microbiology* 15. doi: 10.3389/fmicb.2024.1398886.
- Huang, Lu, Evgeniya V. Nazarova, and David G. Russell. 2019. 'Mycobacterium Tuberculosis: Bacterial Fitness within the Host Macrophage'. *Microbiology Spectrum* 7(2):10.1128/microbiolspec.BAI-0001–2019. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019.
- Huard, Richard C., Michel Fabre, Petra de Haas, Luiz Claudio Oliveira Lazzarini, Dick van Soolingen, Debby Cousins, and John L. Ho. 2006. 'Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the Mycobacterium Tuberculosis Complex'. *Journal of Bacteriology* 188(12):4271–87. doi: 10.1128/JB.01783-05.
- Huo, Fengmin, Jingjing Luo, Jin Shi, Zhaojing Zong, Wei Jing, Wenzhu Dong, Lingling Dong, Yifeng Ma, Qian Liang, Yuanyuan Shang, Hairong Huang, and Yu Pang. 2018. 'A 10-Year Comparative Analysis Shows That Increasing Prevalence of Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in China Is Associated with the Transmission of Strains Harboring Compensatory Mutations'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(4):e02303-17. doi: 10.1128/AAC.02303-17.
- Janssens, J. P., and H. L. Rieder. 2008. 'An Ecological Analysis of Incidence of Tuberculosis and per Capita Gross Domestic Product'. *European Respiratory Journal* 32(5):1415–16. doi: 10.1183/09031936.00078708.
- Jeon, Christie Y., and Megan B. Murray. 2008. 'Diabetes Mellitus Increases the Risk of Active Tuberculosis: A Systematic Review of 13 Observational Studies'. *PLoS Medicine* 5(7):e152. doi: 10.1371/journal.pmed.0050152.
- Jones, R. C., L. G. Harris, S. Morgan, M. C. Ruddy, M. Perry, R. Williams, T. Humphrey, M. Temple, and A. P. Davies. 2019. 'Phylogenetic Analysis of Mycobacterium Tuberculosis Strains in Wales by Use of Core Genome Multilocus Sequence Typing To Analyze Whole-Genome Sequencing Data.' *Journal of Clinical Microbiology* 57(6). doi: 10.1128/JCM.02025-18.
- Jones, Richard M., Kristin N. Adams, Hassan E. Eldesouky, and David R. Sherman. 2022. 'The Evolving Biology of Mycobacterium Tuberculosis Drug Resistance'. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12:1027394. doi: 10.3389/fcimb.2022.1027394.
- Jones-López, Edward C., Soyeon Kim, Geisa Fregona, Patricia Marques-Rodrigues, David Jamil Hadad, Lucilia Pereira Dutra Molina, Solange Vinhas, Nancy Reilly, Stephanie Moine, Soumitesh Chakravorty, Mary Gaeddert, Rodrigo Ribeiro-Rodrigues, Padmini Salgame, Moises Palaci, David Alland, Jerrold J. Ellner, and Reynaldo Dietze. 2014. 'Importance

- of Cough and M. Tuberculosis Strain Type as Risks for Increased Transmission within Households'. *PLoS One* 9(7):e100984. doi: 10.1371/journal.pone.0100984.
- Kawka, Malwina, Renata Płocińska, Przemysław Płociński, Jakub Pawełczyk, Marcin Słomka, Justyna Gatkowska, Katarzyna Dzitko, Bożena Dziadek, and Jarosław Dziadek. 2023. 'The Functional Response of Human Monocyte-Derived Macrophages to Serum Amyloid A and Mycobacterium Tuberculosis Infection'. *Frontiers in Immunology* 14:1238132. doi: 10.3389/fimmu.2023.1238132.
- Kendall, Emily A., Mariam O. Fofana, and David W. Dowdy. 2015a. 'Burden of Transmitted Multidrug Resistance in Epidemics of Tuberculosis: A Transmission Modelling Analysis'. *The Lancet. Respiratory Medicine* 3(12):963–72. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00458-0.
- Kendall, Emily A., Mariam O. Fofana, and David W. Dowdy. 2015b. 'The Burden of Transmitted Multi-Drug Resistance among Epidemics of Tuberculosis: A Transmission Model'. *The Lancet. Respiratory Medicine* 3(12):963–72. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00458-0.
- Knight, Gwenan M., Mirko Zimic, Sebastian Funk, Robert H. Gilman, Jon S. Friedland, and Louis Grandjean. 2018. 'The Relative Fitness of Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis: A Modelling Study of Household Transmission in Peru'. *Journal of The Royal Society Interface* 15(143):20180025. doi: 10.1098/rsif.2018.0025.
- Kodio, Ousmane, Antieme Combo Georges Togo, Yeya Dit Sadio Sarro, Bintou Fane, Fatimata Diallo, Amadou Somboro, Boureima Degoga, Mahamadou Kone, Gagni Coulibaly, Mohamed Tolofoudje, Sidy Bane, Moumine Sanogo, Bourahima Kone, Nadie Coulibaly, Djeneba Dabita, Bocar Baya, Mamoudou Maiga, Flabou Bougoudogo, Fasse Samake, Soukalo Dao, Seydou Doumbia, Souleymane Diallo, and Bassirou Diarra. 2019. 'Competitive Fitness of Mycobacterium Tuberculosis in Vitro'. *International Journal of Mycobacteriology* 8(3):287–91. doi: 10.4103/ijmy.ijmy_97_19.
- Kohl, Thomas A., Roland Diel, Dag Harmsen, Jörg Rothgänger, Karen Meywald Walter, Matthias Merker, Thomas Weniger, and Stefan Niemann. 2014a. 'Whole-Genome-Based Mycobacterium Tuberculosis Surveillance: A Standardized, Portable, and Expandable Approach.' *Journal of Clinical Microbiology* 52(7):2479–86. doi: 10.1128/JCM.00567-14.
- Kohl, Thomas A., Roland Diel, Dag Harmsen, Jörg Rothgänger, Karen Meywald Walter, Matthias Merker, Thomas Weniger, and Stefan Niemann. 2014b. 'Whole-Genome-Based Mycobacterium Tuberculosis Surveillance: A Standardized, Portable, and Expandable Approach.' *Journal of Clinical Microbiology* 52(7):2479–86. doi: 10.1128/JCM.00567-14.
- Költringer, Fiona A., Kristi Sidney Annerstedt, Delia Boccia, Daniel J. Carter, and William E. Rudgard. 2023. 'The Social Determinants of National Tuberculosis Incidence Rates in 116 Countries: A Longitudinal Ecological Study between 2005–2015'. *BMC Public Health* 23(1):337. doi: 10.1186/s12889-023-15213-w.

- Krawczyk, M., A. Brzostek, A. Gorna, K. Knapska, M. Ziolkiewicz, A. Wojtasik, and J. Dziadek. 2011. 'Epidemiological Analysis of Mycobacterium Tuberculosis Strains Isolated in Lodz, Poland.' *Int J Tuberc Lung Dis* 15(9):1252–58. doi: 10.5588/ijtld.10.0718.
- Kuddus, Md Abdul, Emma S. McBryde, and Oyelola A. Adegboye. 2019. 'Delay Effect and Burden of Weather-Related Tuberculosis Cases in Rajshahi Province, Bangladesh, 2007–2012'. *Scientific Reports* 9:12720. doi: 10.1038/s41598-019-49135-8.
- Kwong, J. C., N. McCallum, V. Sintchenko, and B. P. Howden. 2015. 'Whole Genome Sequencing in Clinical and Public Health Microbiology'. *Pathology* 47(3):199–210. doi: 10.1097/PAT.0000000000000235.
- Larkins-Ford, Jonah, Yonatan N. Degefu, Nhi Van, Artem Sokolov, and Bree B. Aldridge. 2022. 'Design Principles to Assemble Drug Combinations for Effective Tuberculosis Therapy Using Interpretable Pairwise Drug Response Measurements'. *Cell Reports Medicine* 3(9):100737. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100737.
- Lee, Robyn S., Nicolas Radomski, Jean-Francois Proulx, Ines Levade, B. Jesse Shapiro, Fiona McIntosh, Hafid Soualhine, Dick Menzies, and Marcel A. Behr. 2015. 'Population Genomics of Mycobacterium Tuberculosis in the Inuit.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(44):13609–14. doi: 10.1073/pnas.1507071112.
- Li, Yameng, Yifan Li, Yao Liu, Xianglong Kong, Ningning Tao, Yawei Hou, Tingting Wang, Qilin Han, Yuzhen Zhang, Fei Long, and Huaichen Li. 2024. 'Iron-Related Gene Mutations Driving Global Mycobacterium Tuberculosis Transmission Revealed by Whole-Genome Sequencing'. *BMC Genomics* 25:249. doi: 10.1186/s12864-024-10152-1.
- Lin, H., S. Shin, J. A. Blaya, Z. Zhang, P. Cegielski, C. Contreras, L. Asencios, C. Bonilla, J. Bayona, C. J. Paciorek, and T. Cohen. 2011. 'Assessing Spatiotemporal Patterns of Multidrug-Resistant and Drug-Sensitive Tuberculosis in a South American Setting'. *Epidemiology and Infection* 139(11):1784–93. doi: 10.1017/S0950268810002797.
- Lin, Hsien-Ho, Majid Ezzati, and Megan Murray. 2007. 'Tobacco Smoke, Indoor Air Pollution and Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *PLoS Medicine* 4(1):e20. doi: 10.1371/journal.pmed.0040020.
- Lin, Yi-Jun, Hsing-Chieh Lin, Ying-Fei Yang, Chi-Yun Chen, Min-Pei Ling, Szu-Chieh Chen, Wei-Yu Chen, Shu-Han You, Tien-Hsuan Lu, and Chung-Min Liao. 2019. 'Association Between Ambient Air Pollution and Elevated Risk of Tuberculosis Development'. *Infection and Drug Resistance* 12:3835–47. doi: 10.2147/IDR.S227823.
- Lönroth, Knut, Ernesto Jaramillo, Brian G. Williams, Christopher Dye, and Mario Raviglione. 2009. 'Drivers of Tuberculosis Epidemics: The Role of Risk Factors and Social Determinants'. *Social Science & Medicine* 68(12):2240–46. doi: 10.1016/j.socscimed.2009.03.041.

- Lovey, Arianne, Sheetal Verma, Vaishnavi Kaipilyawar, Rodrigo Ribeiro-Rodrigues, Seema Husain, Moises Palaci, Reynaldo Dietze, Shuyi Ma, Robert D. Morrison, David R. Sherman, Jerrold J. Ellner, and Padmini Salgame. 2022. 'Early Alveolar Macrophage Response and IL-1R-Dependent T Cell Priming Determine Transmissibility of Mycobacterium Tuberculosis Strains'. *Nature Communications* 13(1):884. doi: 10.1038/s41467-022-28506-2.
- Marakalala, Mohlopheni J., Fernando O. Martinez, Annette Plüddemann, and Siamon Gordon. 2018. 'Macrophage Heterogeneity in the Immunopathogenesis of Tuberculosis'. *Frontiers in Microbiology* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01028.
- Masiewicz, Paweł, Anna Brzostek, Marcin Wolański, Jarosław Dziadek, and Jolanta Zakrzewska-Czerwińska. 2012. 'A Novel Role of the PrpR as a Transcription Factor Involved in the Regulation of Methylcitrate Pathway in Mycobacterium Tuberculosis'. *PLoS One* 7(8):e43651. doi: 10.1371/journal.pone.0043651.
- Mathema, Barun, Jason R. Andrews, Ted Cohen, Martien W. Borgdorff, Marcel Behr, Judith R. Glynn, Roxana Rustomjee, Benjamin J. Silk, and Robin Wood. 2017. 'Drivers of Tuberculosis Transmission.' *The Journal of Infectious Diseases* 216(suppl_6):S644–53. doi: 10.1093/infdis/jix354.
- McEvoy, Christopher R. E., Alecia A. Falmer, Nicolaas C. Gey van Pittius, Thomas C. Victor, Paul D. van Helden, and Robin M. Warren. 2007. 'The Role of IS6110 in the Evolution of Mycobacterium Tuberculosis'. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 87(5):393–404. doi: 10.1016/j.tube.2007.05.010.
- Meehan, Conor J., Galo A. Goig, Thomas A. Kohl, Lennert Verboven, Anzaan Dippenaar, Matthew Ezewudo, Maha R. Farhat, Jennifer L. Guthrie, Kris Laukens, Paolo Miotto, Boatema Ofori-Anyinam, Viola Dreyer, Philip Supply, Anita Suresh, Christian Utpatel, Dick van Soolingen, Yang Zhou, Philip M. Ashton, Daniela Brites, Andrea M. Cabibbe, Bouke C. de Jong, Margaretha de Vos, Fabrizio Menardo, Sebastien Gagneux, Qian Gao, Tim H. Heupink, Qingyun Liu, Chloé Loiseau, Leen Rigouts, Timothy C. Rodwell, Elisa Tagliani, Timothy M. Walker, Robin M. Warren, Yanlin Zhao, Matteo Zignol, Marco Schito, Jennifer Gardy, Daniela M. Cirillo, Stefan Niemann, Inaki Comas, and Annelies Van Rie. 2019. 'Whole Genome Sequencing of Mycobacterium Tuberculosis: Current Standards and Open Issues'. *Nature Reviews. Microbiology* 17(9):533–45. doi: 10.1038/s41579-019-0214-5.
- Melly, Geoff, and Georgiana E. Purdy. 2019. 'MmpL Proteins in Physiology and Pathogenesis of M. Tuberculosis'. *Microorganisms* 7(3):70. doi: 10.3390/microorganisms7030070.
- Merker, Matthias, Maxime Barbier, Helen Cox, Jean-Philippe Rasigade, Silke Feuerriegel, Thomas Andreas Kohl, Roland Diel, Sonia Borrell, Sebastien Gagneux, Vladyslav Nikolayevskyy, Sönke Andres, Ulrich Nübel, Philip Supply, Thierry Wirth, and Stefan Niemann. 2018. 'Compensatory Evolution Drives Multidrug-Resistant Tuberculosis in Central Asia.' *eLife* 7. doi: 10.7554/eLife.38200.

- Merker, Matthias, Jean-Philippe Rasigade, Maxime Barbier, Helen Cox, Silke Feuerriegel, Thomas A. Kohl, Egor Shitikov, Kadri Klaos, Cyril Gaudin, Rudy Antoine, Roland Diel, Sonia Borrell, Sebastien Gagneux, Vladyslav Nikolayevskyy, Sönke Andres, Valeriu Crudu, Philip Supply, Stefan Niemann, and Thierry Wirth. 2022. ‘Transcontinental Spread and Evolution of Mycobacterium Tuberculosis W148 European/Russian Clade toward Extensively Drug Resistant Tuberculosis’. *Nature Communications* 13(1):5105. doi: 10.1038/s41467-022-32455-1.
- Miggiano, Riccardo, Menico Rizzi, and Davide M. Ferraris. 2020. ‘Mycobacterium Tuberculosis Pathogenesis, Infection Prevention and Treatment’. *Pathogens* 9(5):385. doi: 10.3390/pathogens9050385.
- Miller, Loren G., Steven M. Asch, Emily I. Yu, Laura Knowles, Lillian Gelberg, and Paul Davidson. 2000. ‘A Population-Based Survey of Tuberculosis Symptoms: How Atypical Are Atypical Presentations?’ *Clinical Infectious Diseases* 30(2):293–99. doi: 10.1086/313651.
- Millet, Juan-Pablo, Antonio Moreno, Laia Fina, Lucía del Baño, Angels Orcau, Patricia García de Olalla, and Joan A. Caylà. 2013. ‘Factors That Influence Current Tuberculosis Epidemiology’. *European Spine Journal* 22(Suppl 4):539–48. doi: 10.1007/s00586-012-2334-8.
- Mishra, Abhishek, Vipul K. Singh, Chinnaswamy Jagannath, Selvakumar Subbian, Blanca I. Restrepo, Marie-Claire Gauduin, and Arshad Khan. 2022. ‘Human Macrophages Exhibit GM-CSF Dependent Restriction of Mycobacterium Tuberculosis Infection via Regulating Their Self-Survival, Differentiation and Metabolism’. *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.859116.
- Mishra, Saurabh, and Kohta Saito. 2022. ‘Clinically Encountered Growth Phenotypes of Tuberculosis-Causing Bacilli and Their in Vitro Study: A Review’. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12. doi: 10.3389/fcimb.2022.1029111.
- Mitruka, Kiren, Haley Blake, Philip Ricks, Roque Miramontes, Sapna Bamrah, Carla Chee, and Laurie Hickstein. 2014. ‘A Tuberculosis Outbreak Fueled by Cross-Border Travel and Illicit Substances: Nevada and Arizona’. *Public Health Reports* 129(1):78–85.
- Mokrousov, Igor, Anna Vyazovaya, Egor Shitikov, Maria Badleeva, Olesya Belopolskaya, Dmitry Bespiatykh, Alena Gerasimova, Panayotis Ioannidis, Weiwei Jiao, Polina Khromova, Aleksey Masharsky, Dinara Naizabayeva, Dimitrios Papaventsis, Oksana Pasechnik, João Perdigão, Nalin Rastogi, Adong Shen, Viacheslav Sinkov, Yuriy Skiba, Natalia Solovieva, Silva Tafaj, Violeta Valcheva, Irina Kostyukova, Svetlana Zhdanova, Viacheslav Zhuravlev, and Oleg Ogarkov. 2023. ‘Insight into Pathogenomics and Phylogeography of Hypervirulent and Highly-Lethal Mycobacterium Tuberculosis Strain Cluster’. *BMC Infectious Diseases* 23(1):426. doi: 10.1186/s12879-023-08413-7.
- Moopanar, Kynasha, Asanda Nomfundo Graduate Nyide, Sibusiso Senzani, and Nontobeko Eunice Mvubu. 2022. ‘Clinical Strains of Mycobacterium Tuberculosis Exhibit

- Differential Lipid Metabolism-Associated Transcriptome Changes in in Vitro Cholesterol and Infection Models'. *Pathogens and Disease* 81:ftac046. doi: 10.1093/femspd/ftac046.
- Mtei, Lillian, Mecky Matee, Oliver Herfort, Muhammad Bakari, C. Robert Horsburgh, Richard Waddell, Bernard F. Cole, Jenni M. Vuola, Susan Tvaroha, Barry Kreiswirth, Kisali Pallangyo, and C. Fordham von Reyn. 2005. 'High Rates of Clinical and Subclinical Tuberculosis among HIV-Infected Ambulatory Subjects in Tanzania'. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 40(10):1500–1507. doi: 10.1086/429825.
- Nagabhushanam, Vijaya, Alejandra Solache, Li-Min Ting, Claire J. Escaron, Jennifer Y. Zhang, and Joel D. Ernst. 2003. 'Innate Inhibition of Adaptive Immunity: Mycobacterium Tuberculosis-Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN- γ 1'. *The Journal of Immunology* 171(9):4750–57. doi: 10.4049/jimmunol.171.9.4750.
- Narasimhan, Padmanesan, James Wood, Chandini Raina MacIntyre, and Dilip Mathai. 2013. 'Risk Factors for Tuberculosis'. *Pulmonary Medicine* 2013:828939. doi: 10.1155/2013/828939.
- Nebenzahl-Guimaraes, Hanna, Arjan van Laarhoven, Maha R. Farhat, Valerie A. C. M. Koeken, Jornt J. Mandemakers, Aldert Zomer, Sacha A. F. T. van Hijum, Mihai G. Netea, Megan Murray, Reinout van Crevel, and Dick van Soolingen. 2017. 'Transmissible Mycobacterium Tuberculosis Strains Share Genetic Markers and Immune Phenotypes.' *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 195(11):1519–27. doi: 10.1164/rccm.201605-1042OC.
- Negrete-Paz, Andrea Monserrat, Gerardo Vázquez-Marrufo, and Ma Soledad Vázquez-Garcidueñas. 2021. 'Whole-Genome Comparative Analysis at the Lineage/Sublineage Level Discloses Relationships between Mycobacterium Tuberculosis Genotype and Clinical Phenotype'. *PeerJ* 9. doi: 10.7717/peerj.12128.
- Neuvonen, Maarit, Moutusi Manna, Sini Mokkila, Matti Javanainen, Tomasz Rog, Zheng Liu, Robert Bittman, Ilpo Vattulainen, and Elina Ikonen. 2014. 'Enzymatic Oxidation of Cholesterol: Properties and Functional Effects of Cholestenone in Cell Membranes'. *PLoS ONE* 9(8):e103743. doi: 10.1371/journal.pone.0103743.
- Nikolayevskyy, V., S. Niemann, R. Anthony, D. van Soolingen, E. Tagliani, C. Ködmön, M. J. van der Werf, and D. M. Cirillo. 2019. 'Role and Value of Whole Genome Sequencing in Studying Tuberculosis Transmission'. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 25(11):1377–82. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.022.
- Nnoaham, Kelechi E., and Aileen Clarke. 2008. 'Low Serum Vitamin D Levels and Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *International Journal of Epidemiology* 37(1):113–19. doi: 10.1093/ije/dym247.
- Okhovat-Isfahani, Batoul, Saeid Bitaraf, Mohammad Ali Mansournia, and Amin Doosti-Irani. 2019. 'Inequality in the Global Incidence and Prevalence of Tuberculosis (TB) and

- TB/HIV According to the Human Development Index'. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 33:45. doi: 10.34171/mjiri.33.45.
- Oliver, James D. 2010. 'Recent Findings on the Viable but Nonculturable State in Pathogenic Bacteria'. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4):415–25. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x.
- Omae, Yosuke, Licht Toyo-oka, Hideki Yanai, Supalert Nedsuwan, Sukanya Wattanapokayakit, Nusara Satproedprai, Nat Smittipat, Prasit Palittapongarnpim, Pathom Sawanpanyalert, Wimala Inunchot, Ekawat Pasomsub, Nuanjun Wichukchinda, Taisei Mushiroda, Michiaki Kubo, Katsushi Tokunaga, and Surakameth Mahasirimongkol. 2017. 'Pathogen Lineage-Based Genome-Wide Association Study Identified CD53 as Susceptible Locus in Tuberculosis'. *Journal of Human Genetics* 62(12):1015–22. doi: 10.1038/jhg.2017.82.
- Onozuka, Daisuke, and Akihito Hagihara. 2015. 'The Association of Extreme Temperatures and the Incidence of Tuberculosis in Japan'. *International Journal of Biometeorology* 59(8):1107–14. doi: 10.1007/s00484-014-0924-3.
- Pagán, Antonio J., and Lalita Ramakrishnan. 2018. 'The Formation and Function of Granulomas'. *Annual Review of Immunology* 36:639–65. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100022.
- Parish, Tanya, and Neil G. Stoker. 2001. *Mycobacterium Tuberculosis Protocols*. Vol. 54. New Jersey: Humana Press.
- Park, Young Kil, Sonya Shin, Sungweon Ryu, Sang Nae Cho, Won-Jung Koh, O. Jung Kwon, Young Soo Shim, Woo Jin Lew, and Gill Han Bai. 2005. 'Comparison of Drug Resistance Genotypes between Beijing and Non-Beijing Family Strains of *Mycobacterium Tuberculosis* in Korea'. *Journal of Microbiological Methods* 63(2):165–72. doi: 10.1016/j.mimet.2005.03.002.
- Parrish, N. M., J. D. Dick, and W. R. Bishai. 1998. 'Mechanisms of Latency in *Mycobacterium Tuberculosis*'. *Trends in Microbiology* 6(3):107–12. doi: 10.1016/s0966-842x(98)01216-5.
- Pathak, Dimpal, Guru Vasishtha, and Sanjay K. Mohanty. 2021. 'Association of Multidimensional Poverty and Tuberculosis in India'. *BMC Public Health* 21(1):2065. doi: 10.1186/s12889-021-12149-x.
- Pattanaik, Kali Prasad, Geetanjali Ganguli, Sumanta Kumar Naik, and Avinash Sonawane. 2021. 'Mycobacterium Tuberculosis EsxL Induces TNF- α Secretion through Activation of TLR2 Dependent MAPK and NF- κ B Pathways'. *Molecular Immunology* 130:133–41. doi: 10.1016/j.molimm.2020.11.020.
- Pérez-Lago, Laura, Iñaki Comas, Yurena Navarro, Fernando González-Candelas, Marta Herranz, Emilio Bouza, and Darío García-de-Viedma. 2014. 'Whole Genome Sequencing Analysis of Intrapatient Microevolution in *Mycobacterium Tuberculosis*: Potential Impact on the

- Inference of Tuberculosis Transmission.’ *The Journal of Infectious Diseases* 209(1):98–108. doi: 10.1093/infdis/jit439.
- Peters, Julian S., Nabila Ismail, Anzaan Dippenaar, Shuyi Ma, David R. Sherman, Robin M. Warren, and Baves D. Kana. 2020. ‘Genetic Diversity in *Mycobacterium Tuberculosis* Clinical Isolates and Resulting Outcomes of Tuberculosis Infection and Disease’. *Annual Review of Genetics* 54(1):511–37. doi: 10.1146/annurev-genet-022820-085940.
- Pieters, Jean. 2008. ‘Mycobacterium Tuberculosis and the Macrophage: Maintaining a Balance’. *Cell Host & Microbe* 3(6):399–407. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.006.
- Pitcher, Robert S., Andrew J. Green, Anna Brzostek, Malgorzata Korycka-Machala, Jaroslaw Dziadek, and Aidan J. Doherty. 2007. ‘NHEJ Protects Mycobacteria in Stationary Phase against the Harmful Effects of Desiccation’. *DNA Repair* 6(9):1271–76. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.02.009.
- Placeres, Aline Ferreira, Débora de Almeida Soares, Felipe Mendes Delpino, Heriederson Sávio Dias Moura, Alessandro Rolim Scholze, Márcio Souza dos Santos, Ricardo Alexandre Arcêncio, and Inês Fronteira. 2023. ‘Epidemiology of TB in Prisoners: A Metanalysis of the Prevalence of Active and Latent TB’. *BMC Infectious Diseases* 23(1):20. doi: 10.1186/s12879-022-07961-8.
- Portevin, Damien, Sébastien Gagneux, Iñaki Comas, and Douglas Young. 2011. ‘Human Macrophage Responses to Clinical Isolates from the Mycobacterium Tuberculosis Complex Discriminate between Ancient and Modern Lineages’. *PLoS Pathogens* 7(3):e1001307. doi: 10.1371/journal.ppat.1001307.
- Queval, Christophe J., Roland Brosch, and Roxane Simeone. 2017. ‘The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against Mycobacterium Tuberculosis’. *Frontiers in Microbiology* 8:2284. doi: 10.3389/fmicb.2017.02284.
- Rabahi, Marcelo Fouad, Emilyn Costa Conceição, Luísa Oliveira de Paiva, Marcos Vinícius Muniz Lemes Souto, Maria Carolina Sisco, Jacobus de Waard, Paulo Cesar de Souza Caldas, Fatima Fandinho, Jesus Pais Ramos, Luciana Distasio de Carvalho, Carlos Eduardo Dias Campos, Karla Valéria Batista Lima, Sandro Patroca da Silva, Abhinav Sharma, Jaime Robledo, Uriel Alonso Hurtado Paez, Rafael Silva Duarte, Marlei Gomes da Silva, Lia Lima Gomes, Sidra Ezidio Gonçalves Vasconcellos, Cecile Uwezeye, Bouke C. de Jong, Ana Paula Junqueira-Kipnis, and Philip Noel Suffys. 2020. ‘Characterization of Mycobacterium Tuberculosis Var. Africanum Isolated from a Patient with Pulmonary Tuberculosis in Brazil.’ *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 85:104550. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104550.
- Reiling, Norbert, Susanne Homolka, Kerstin Walter, Julius Brandenburg, Lisa Niwinski, Martin Ernst, Christian Herzmann, Christoph Lange, Roland Diel, Stefan Ehlers, and Stefan Niemann. 2013. ‘Clade-Specific Virulence Patterns of Mycobacterium Tuberculosis Complex Strains in Human Primary Macrophages and Aerogenically Infected Mice’. *mBio* 4(4):10.1128/mbio.00250-13. doi: 10.1128/mbio.00250-13.

- Reyes, Josephine F., Carmen H. S. Chan, and Mark M. Tanaka. 2012. 'Impact of Homoplasmy on Variable Numbers of Tandem Repeats and Spoligotypes in Mycobacterium Tuberculosis.' *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 12(4):811–18. doi: 10.1016/j.meegid.2011.05.018.
- Ribeiro, Simone C. M., Lia Lima Gomes, Eduardo P. Amaral, Marcelle R. M. Andrade, Fabricio M. Almeida, Andreza L. Rezende, Verônica R. Lanes, Eulógio C. Q. Carvalho, Philip N. Suffys, Igor Mokrousov, and Elena B. Lasunskaja. 2014. 'Mycobacterium Tuberculosis Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely to Display Increased Virulence than Strains of the Ancient Sublineage'. *Journal of Clinical Microbiology* 52(7):2615–24. doi: 10.1128/JCM.00498-14.
- Riojas, Marco A., Katya J. McGough, Cristin J. Rider-Riojas, Nalin Rastogi, and Manzour Hernando Hazbón. 2018. 'Phylogenomic Analysis of the Species of the Mycobacterium Tuberculosis Complex Demonstrates That Mycobacterium Africanum, Mycobacterium Bovis, Mycobacterium Caprae, Mycobacterium Microti and Mycobacterium Pinnipedii Are Later Heterotypic Synonyms of Mycobacterium Tuberculosis'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68(1):324–32. doi: 10.1099/ijsem.0.002507.
- Rodríguez-Morales, Alfonso J., and Diana M. Castañeda-Hernández. 2012. 'Relationships between Morbidity and Mortality from Tuberculosis and the Human Development Index (HDI) in Venezuela, 1998–2008'. *International Journal of Infectious Diseases* 16(9):e704–5. doi: 10.1016/j.ijid.2012.04.011.
- Rustad, Tige R., Maria I. Harrell, Reiling Liao, and David R. Sherman. 2008. 'The Enduring Hypoxic Response of Mycobacterium Tuberculosis'. *PLOS ONE* 3(1):e1502. doi: 10.1371/journal.pone.0001502.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. 'DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12):5463–67.
- Sarathy, Jansy P., and Véronique Dartois. 2020. 'Caseum: A Niche for Mycobacterium Tuberculosis Drug-Tolerant Persisters'. *Clinical Microbiology Reviews* 33(3):e00159-19. doi: 10.1128/CMR.00159-19.
- Schmidt, Charles W. 2008. 'Linking TB and the Environment: An Overlooked Mitigation Strategy'. *Environmental Health Perspectives* 116(11):A478–85.
- Scriba, Thomas J., Andrew Fiore-Gartland, Adam Penn-Nicholson, Humphrey Mulenga, Stanley Kimbung Mbandi, Bhavesh Borate, Simon C. Mendelsohn, Katie Hadley, Chris Hikuam, Masooda Kaskar, Munyaradzi Musvosvi, Nicole Bilek, Steven Self, Tom Sumner, Richard G. White, Mzwandile Erasmus, Lungisa Jaxa, Rodney Raphela, Craig Innes, William Brumskine, Andriëtte Hiemstra, Stephanus T. Malherbe, Razia Hassan-Moosa, Michèle Tameris, Gerhard Walzl, Kogieleum Naidoo, Gavin Churchyard, and Mark Hatherill. 2021. 'Biomarker-Guided Tuberculosis Preventive Therapy (CORTIS): A

- Randomised Controlled Trial'. *The Lancet. Infectious Diseases* 21(3):354–65. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30914-2.
- S raphin, Marie Nancy, Anders Norman, Erik Michael Rasmussen, Alexandra M. Gerace, Calin B. Chiribau, Marie-Claire Rowlinson, Troels Lillebaek, and Michael Lauzardo. 2019. 'Direct Transmission of Within-Host Mycobacterium Tuberculosis Diversity to Secondary Cases Can Lead to Variable between-Host Heterogeneity without de Novo Mutation: A Genomic Investigation'. *EBioMedicine* 47:293–300. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.08.010.
- Shi, Jie, Danwei Zheng, Yankun Zhu, Xiaoguang Ma, Shaohua Wang, Hui Li, and Jin Xing. 2018. 'Role of MIRU-VNTR and Spoligotyping in Assessing the Genetic Diversity of Mycobacterium Tuberculosis in Henan Province, China.' *BMC Infectious Diseases* 18(1):447. doi: 10.1186/s12879-018-3351-y.
- Silva, Marta L., Baltazar C , Nuno S. Osório, Pedro N. S. Rodrigues, Ana Raquel Maceiras, and Margarida Saraiva. 2022. 'Tuberculosis Caused by Mycobacterium Africanum: Knowns and Unknowns'. *PLOS Pathogens* 18(5):e1010490. doi: 10.1371/journal.ppat.1010490.
- Silv rio, Diogo, Rute Gonçalves, Rui Appelberg, and Margarida Saraiva. 2021. 'Advances on the Role and Applications of Interleukin-1 in Tuberculosis'. *mBio* 12(6):e03134-21. doi: 10.1128/mBio.03134-21.
- Singh, Pratibha, V. M. Katoch, K. K. Mohanty, and Devendra Singh Chauhan. 2016. 'Analysis of Expression Profile of Mce Operon Genes (Mce1, Mce2, Mce3 Operon) in Different Mycobacterium Tuberculosis Isolates at Different Growth Phases'. *The Indian Journal of Medical Research* 143(4):487–94. doi: 10.4103/0971-5916.184305.
- Siroka, Andrew, Knut Lönnroth, and Ninez Ponce. 2016. 'The Impact of Social Protection on Tuberculosis Rates: A Global Analysis'. *The Lancet. Infectious Diseases* 16(4):473–79. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00401-6.
- Slatko, Barton E., Andrew F. Gardner, and Frederick M. Ausubel. 2018. 'Overview of Next Generation Sequencing Technologies'. *Current Protocols in Molecular Biology* 122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59.
- Smith, Noel H., Stephen V. Gordon, Ricardo de la Rua-Domenech, Richard S. Clifton-Hadley, and R. Glyn Hewinson. 2006. 'Bottlenecks and Broomsticks: The Molecular Evolution of Mycobacterium Bovis'. *Nature Reviews. Microbiology* 4(9):670–81. doi: 10.1038/nrmicro1472.
- Sobkowiak, Benjamin, Louis Banda, Themba Mzembe, Amelia C. Crampin, Judith R. Glynn, and Taane G. Clark. 2020. 'Bayesian Reconstruction of Mycobacterium Tuberculosis Transmission Networks in a High Incidence Area over Two Decades in Malawi Reveals Associated Risk Factors and Genomic Variants'. *Microbial Genomics* 6(4):e000361. doi: 10.1099/mgen.0.000361.

- van Soolingen, D., L. Qian, P. E. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H. Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, and J. D. van Embden. 1995. 'Predominance of a Single Genotype of Mycobacterium Tuberculosis in Countries of East Asia'. *Journal of Clinical Microbiology* 33(12):3234–38.
- van Soolingen, Dick, Petra E. W. de Haas, H. Rogier van Doorn, Ed Kuijper, Heinz Rinder, and Martien W. Borgdorff. 2000. 'Mutations at Amino Acid Position 315 of the katG Gene Are Associated with High-Level Resistance to Isoniazid, Other Drug Resistance, and Successful Transmission of Mycobacterium Tuberculosis in The Netherlands'. *The Journal of Infectious Diseases* 182(6):1788–90. doi: 10.1086/317598.
- Stucki, David, Daniela Brites, Leïla Jeljeli, Mireia Coscolla, Qingyun Liu, Andrej Trauner, Lukas Fenner, Liliana Rutaihwa, Sonia Borrell, Tao Luo, Qian Gao, Midori Kato-Maeda, Marie Ballif, Matthias Egger, Rita Macedo, Helmi Mardassi, Milagros Moreno, Griselda Tundo Vilanova, Janet Fyfe, Maria Globan, Jackson Thomas, Frances Jamieson, Jennifer L. Guthrie, Adwoa Asante-Poku, Dorothy Yeboah-Manu, Eddie Wampande, Willy Ssengooba, Moses Joloba, W. Henry Boom, Indira Basu, James Bower, Margarida Saraiva, Sidra E. G. Vaconcellos, Philip Suffys, Anastasia Koch, Robert Wilkinson, Linda Gail-Bekker, Bijaya Malla, Serej D. Ley, Hans-Peter Beck, Bouke C. de Jong, Kadri Toit, Elisabeth Sanchez-Padilla, Maryline Bonnet, Ana Gil-Brusola, Matthias Frank, Veronique N. Penlap Beng, Kathleen Eisenach, Issam Alani, Perpetual Wangui Ndung'u, Gunturu Revathi, Florian Gehre, Suriya Akter, Francine Ntoumi, Lynsey Stewart-Isherwood, Nyanda E. Ntinginya, Andrea Rachow, Michael Hoelscher, Daniela Maria Cirillo, Girts Skenders, Sven Hoffner, Daiva Bakonyte, Petras Stakenas, Roland Diel, Valeriu Crudu, Olga Moldovan, Sahal Al-Hajoj, Larissa Otero, Francesca Barletta, E. Jane Carter, Lameck Diero, Philip Supply, Iñaki Comas, Stefan Niemann, and Sebastien Gagneux. 2016. 'Mycobacterium Tuberculosis Lineage 4 Comprises Globally Distributed and Geographically Restricted Sublineages'. *Nature Genetics* 48(12):1535–43. doi: 10.1038/ng.3704.
- Sulis, Giorgia, Alberto Roggi, Alberto Matteelli, and Mario C. Raviglione. 2014. 'Tuberculosis: Epidemiology and Control'. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 6(1):e2014070. doi: 10.4084/MJHID.2014.070.
- Sun, Y. J., A. S. G. Lee, S. Y. Wong, and N. I. Paton. 2006. 'Association of Mycobacterium Tuberculosis Beijing Genotype with Tuberculosis Relapse in Singapore'. *Epidemiology and Infection* 134(2):329–32. doi: 10.1017/S095026880500525X.
- Supply, Philip, Caroline Allix, Sarah Lesjean, Mara Cardoso-Oelemann, Sabine Rüsç-Gerdes, Eve Willery, Evgueni Savine, Petra de Haas, Henk van Deutekom, Solvig Roring, Pablo Bifani, Natalia Kurepina, Barry Kreiswirth, Christophe Sola, Nalin Rastogi, Vincent Vatin, Maria Cristina Gutierrez, Maryse Fauville, Stefan Niemann, Robin Skuce, Kristin Kremer, Camille Loch, and Dick van Soolingen. 2006. 'Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of Mycobacterium Tuberculosis.' *Journal of Clinical Microbiology* 44(12):4498–4510. doi: 10.1128/JCM.01392-06.

- Supply, Philip, Edith Mazars, Sarah Lesjean, Véronique Vincent, Brigitte Gicquel, and Camille Locht. 2000. 'Variable Human Minisatellite-like Regions in the Mycobacterium Tuberculosis Genome'. *Molecular Microbiology* 36(3):762–71. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01905.x.
- Swai, Hedwiga F., Ferdinand M. Mugusi, and Jessie K. Mbwambo. 2011. 'Sputum Smear Negative Pulmonary Tuberculosis: Sensitivity and Specificity of Diagnostic Algorithm'. *BMC Research Notes* 4(1):475. doi: 10.1186/1756-0500-4-475.
- The end TB strategy. 2015. 'The End TB Strategy'. Retrieved 8 June 2023 (<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-TB-2015.19>).
- Thierry, D., M. D. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, and J. L. Guesdon. 1990. 'IS6110, an IS-like Element of Mycobacterium Tuberculosis Complex.' *Nucleic Acids Research* 18(1):188.
- Thwaites, Guy, Maxine Caws, Tran Thi Hong Chau, Anthony D'Sa, Nguyen Thi Ngoc Lan, Mai Nguyet Thu Huyen, Sebastien Gagneux, Phan Thi Hoang Anh, Dau Quang Tho, Estee Torok, Nguyen Thi Quynh Nhu, Nguyen Thi Hong Duyen, Phan Minh Duy, Jonathan Richenberg, Cameron Simmons, Tran Tinh Hien, and Jeremy Farrar. 2008. 'Relationship between Mycobacterium Tuberculosis Genotype and the Clinical Phenotype of Pulmonary and Meningeal Tuberculosis'. *Journal of Clinical Microbiology* 46(4):1363–68. doi: 10.1128/JCM.02180-07.
- Tishkoff, Sarah A., Floyd A. Reed, Françoise R. Friedlaender, Christopher Ehret, Alessia Ranciaro, Alain Froment, Jibril B. Hirbo, Agnes A. Awomoyi, Jean-Marie Bodo, Ogobara Doumbo, Muntaser Ibrahim, Abdalla T. Juma, Maritha J. Kotze, Godfrey Lema, Jason H. Moore, Holly Mortensen, Thomas B. Nyambo, Sabah A. Omar, Kweli Powell, Gideon S. Pretorius, Michael W. Smith, Mahamadou A. Thera, Charles Wambebe, James L. Weber, and Scott M. Williams. 2009. 'The Genetic Structure and History of Africans and African Americans'. *Science (New York, N.Y.)* 324(5930):1035–44. doi: 10.1126/science.1172257.
- Torres Ortiz, Arturo, Jorge Coronel, Julia Rios Vidal, Cesar Bonilla, David A. J. Moore, Robert H. Gilman, Francois Balloux, Onn Min Kon, Xavier Didelot, and Louis Grandjean. 2021. 'Genomic Signatures of Pre-Resistance in Mycobacterium Tuberculosis'. *Nature Communications* 12(1):7312. doi: 10.1038/s41467-021-27616-7.
- Traore, B., B. Diarra, B. P. P. Dembele, A. M. Somboro, A. S. Hammond, S. Siddiqui, M. Maiga, B. Kone, Y. S. Sarro, J. Washington, M. Parta, N. Coulibaly, O. M'baye, S. Diallo, O. Koita, A. Tounkara, and M. A. Polis. 2012. 'Molecular Strain Typing of Mycobacterium Tuberculosis Complex in Bamako, Mali.' *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 16(7):911–16. doi: 10.5588/ijtld.11.0397.
- Trauner, Andrej, Qingyun Liu, Laura E. Via, Xin Liu, Xianglin Ruan, Lili Liang, Huimin Shi, Ying Chen, Ziling Wang, Ruixia Liang, Wei Zhang, Wang Wei, Jingcai Gao, Gang Sun, Daniela Brites, Kathleen England, Guolong Zhang, Sebastien Gagneux, Clifton E. Barry,

- and Qian Gao. 2017. ‘The Within-Host Population Dynamics of Mycobacterium Tuberculosis Vary with Treatment Efficacy’. *Genome Biology* 18:71. doi: 10.1186/s13059-017-1196-0.
- Turner, Richard D., Christopher Chiu, Gavin J. Churchyard, Hanif Esmail, David M. Lewinsohn, Neel R. Gandhi, and Kevin P. Fennelly. 2017. ‘Tuberculosis Infectiousness and Host Susceptibility’. *The Journal of Infectious Diseases* 216(suppl_6):S636–43. doi: 10.1093/infdis/jix361.
- Turner, Richard Douglas. 2019. ‘Cough in Pulmonary Tuberculosis: Existing Knowledge and General Insights’. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 55:89–94. doi: 10.1016/j.pupt.2019.01.008.
- Upadhyay, S., E. Mittal, and J. A. Philips. 2018. ‘Tuberculosis and the Art of Macrophage Manipulation’. *Pathogens and Disease* 76(4):fty037. doi: 10.1093/femspd/fty037.
- Utpatel, Christian, Milagros Zavaleta, Daniel Rojas-Bolivar, Andreas Mühlbach, Janet Picoy, Walter Portugal, Ana Esteve-Solé, Laia Alsina, Paolo Miotto, Daniella C. Bartholomeu, Jorge Sanchez, Diego F. Cuadros, Jorge O. Alarcon, Stefan Niemann, and Moises A. Huaman. 2024. ‘Prison as a Driver of Recent Transmissions of Multidrug-Resistant Tuberculosis in Callao, Peru: A Cross-Sectional Study’. *The Lancet Regional Health - Americas* 100674. doi: 10.1016/j.lana.2024.100674.
- Van Soolingen, D. 2001. ‘Molecular Epidemiology of Tuberculosis and Other Mycobacterial Infections: Main Methodologies and Achievements’. *Journal of Internal Medicine* 249(1):1–26. doi: 10.1046/j.1365-2796.2001.00772.x.
- Velen, Kavindhran, and Salome Charalambous. 2021. ‘Tuberculosis in Prisons: An Unintended Sentence?’ *The Lancet Public Health* 6(5):e263–64. doi: 10.1016/S2468-2667(21)00049-9.
- Verma, Sheetal, Kamlesh Bhatt, Arianne Lovey, Rodrigo Ribeiro-Rodrigues, Joan Durbin, Edward C. Jones-López, Moises Palaci, Solange A. Vinas, David Alland, Reynaldo Dietze, Jerrold J. Ellner, and Padmini Salgame. 2019. ‘Transmission Phenotype of Mycobacterium Tuberculosis Strains Is Mechanistically Linked to Induction of Distinct Pulmonary Pathology’ edited by M. A. Behr. *PLOS Pathogens* 15(3):e1007613. doi: 10.1371/journal.ppat.1007613.
- Viney, Kerri, Nguyen Nhat Linh, Medea Gegia, Matteo Zignol, Philippe Glaziou, Nazir Ismail, Tereza Kasaeva, and Fuad Mirzayev. 2021. ‘New Definitions of Pre-Extensively and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Update from the World Health Organization’. *European Respiratory Journal* 57(4). doi: 10.1183/13993003.00361-2021.
- Warner, Digby F., Suzana Savvi, Valerie Mizrahi, and Stephanie S. Dawes. 2007. ‘A Riboswitch Regulates Expression of the Coenzyme B12-Independent Methionine Synthase in Mycobacterium Tuberculosis: Implications for Differential Methionine Synthase Function in Strains H37Rv and CDC1551’. *Journal of Bacteriology* 189(9):3655–59. doi: 10.1128/JB.00040-07.

- Wayne, L. G., and L. G. Hayes. 1996. 'An in Vitro Model for Sequential Study of Shiftdown of Mycobacterium Tuberculosis through Two Stages of Nonreplicating Persistence.' *Infection and Immunity* 64(6):2062–69.
- Wiens, Kirsten E., Lauren P. Woyczynski, Jorge R. Ledesma, Jennifer M. Ross, Roberto Zenteno-Cuevas, Amador Goodridge, Irfan Ullah, Barun Mathema, Joel Fleury Djoba Siawaya, Molly H. Biehl, Sarah E. Ray, Natalia V. Bhattacharjee, Nathaniel J. Henry, Robert C. Reiner, Hmwe H. Kyu, Christopher J. L. Murray, and Simon I. Hay. 2018. 'Global Variation in Bacterial Strains That Cause Tuberculosis Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis'. *BMC Medicine* 16(1):196. doi: 10.1186/s12916-018-1180-x.
- Williams, Caroline M., Mohamad Abdulwhhab, Surinder S. Birring, Elsabe De Kock, Natalie J. Garton, Eleanor Townsend, Manish Pareek, Alaa Al-Taie, Jingzhe Pan, Rakesh Ganatra, Anton C. Stoltz, Pranabashis Haldar, and Michael R. Barer. 2020. 'Exhaled Mycobacterium Tuberculosis Output and Detection of Subclinical Disease by Face-Mask Sampling: Prospective Observational Studies'. *The Lancet. Infectious Diseases* 20(5):607–17. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30707-8.
- Wu, Haibo, Yongsheng Wang, Yan Zhang, Mingqi Yang, Jiaying Lv, Jun Liu, and Yong Zhang. 2015. 'TALE Nickase-Mediated SP110 Knockin Endows Cattle with Increased Resistance to Tuberculosis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(13):E1530–39. doi: 10.1073/pnas.1421587112.
- Wurie, Fatima B., Stephen D. Lawn, Helen Booth, Pam Sonnenberg, and Andrew C. Hayward. 2016. 'Bioaerosol Production by Patients with Tuberculosis during Normal Tidal Breathing: Implications for Transmission Risk'. *Thorax* 71(6):549–54. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207295.
- Wyllie, David H., Jennifer A. Davidson, E. Grace Smith, Priti Rathod, Derrick W. Crook, Tim E. A. Peto, Esther Robinson, Tim Walker, and Colin Campbell. 2018. 'A Quantitative Evaluation of MIRU-VNTR Typing Against Whole-Genome Sequencing for Identifying Mycobacterium Tuberculosis Transmission: A Prospective Observational Cohort Study.' *EBioMedicine* 34:122–30. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.07.019.
- Xu, Luoling, David J. Kelvin, George Q. Ye, Dennis D. Taub, Adit Ben-Baruch, Joost J. Oppenheim, and Ji Ming Wang. 1995. 'Modulation of IL-8 Receptor Expression on Purified Human T Lymphocytes Is Associated with Changed Chemotactic Responses to IL-8'. *Journal of Leukocyte Biology* 57(2):335–42. doi: 10.1002/jlb.57.2.335.
- Xu, M., Y. Li, B. Liu, R. Chen, L. Sheng, S. Yan, H. Chen, J. Hou, L. Yuan, L. Ke, M. Fan, and P. Hu. 2020. 'Temperature and Humidity Associated with Increases in Tuberculosis Notifications: A Time-Series Study in Hong Kong'. *Epidemiology and Infection* 149:e8. doi: 10.1017/S0950268820003040.
- Zelner, Jonathan L., Megan B. Murray, Mercedes C. Becerra, Jerome Galea, Leonid Lecca, Roger Calderon, Rosa Yataco, Carmen Contreras, Zibiao Zhang, Bryan T. Grenfell, and Ted Cohen. 2014. 'Age-Specific Risks of Tuberculosis Infection From Household and

- Community Exposures and Opportunities for Interventions in a High-Burden Setting'. *American Journal of Epidemiology* 180(8):853. doi: 10.1093/aje/kwu192.
- Zhang, Qi-ao, Shaying Ma, Peibo Li, and Jianping Xie. 2023. 'The Dynamics of *Mycobacterium Tuberculosis* Phagosome and the Fate of Infection'. *Cellular Signalling* 108:110715. doi: 10.1016/j.celsig.2023.110715.
- Zhang, Tian-Ping, Rui Li, Li-Jun Wang, Fei Tang, and Hong-Miao Li. 2022. 'Clinical Relevance of Vitamin B12 Level and Vitamin B12 Metabolic Gene Variation in Pulmonary Tuberculosis'. *Frontiers in Immunology* 13.
- Zhang, Ying, Wing Wai Yew, and Michael R. Barer. 2012. 'Targeting Persisters for Tuberculosis Control'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(5):2223–30. doi: 10.1128/AAC.06288-11.
- Zhu, Chendi, Tingting Yang, Jinfeng Yin, Hui Jiang, Howard E. Takiff, Qian Gao, Qingyun Liu, and Weimin Li. 2023. 'The Global Success of *Mycobacterium Tuberculosis* Modern Beijing Family Is Driven by a Few Recently Emerged Strains'. *Microbiology Spectrum* 0(0):e03339-22. doi: 10.1128/spectrum.03339-22.
- Żukowska, Lidia, Daria Zygała-Pytlos, Katarzyna Struś, Anna Zabost, Monika Kozińska, Ewa Augustynowicz-Kopeć, Jarosław Dziadek, and Alina Minias. 2023. 'An Overview of Tuberculosis Outbreaks Reported in the Years 2011–2020'. *BMC Infectious Diseases* 23(1):253. doi: 10.1186/s12879-023-08197-w.
- Zuñiga, Joaquin, Diana Torres-García, Teresa Santos-Mendoza, Tatiana S. Rodriguez-Reyna, Julio Granados, and Edmond J. Yunis. 2012. 'Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis'. *Clinical and Developmental Immunology* 2012:193923. doi: 10.1155/2012/193923.

Aneks 1. Wykaz szczepów wykorzystywanych do wyłonienia grup szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych pracy doktorskiej.

Gatunek	Nazwa szczepu	Źródło
<i>M. tuberculosis</i>	1396_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	1410_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	1531_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	1678_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	2065_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	262_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	2904_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	2948_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	3055_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	3413_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	355_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	3669_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	372_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	3835_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	384_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	3863_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	3865_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	4217_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	422_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	4389_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	463_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	4670_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	5066_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	5127_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	543_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	5764_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	5917_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	5974_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	6149_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	6577_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	6906_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	7115_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	7363_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	738_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	748_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	7748_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	78_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	8015_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	8069_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	837_NT	IGiChP

<i>M. tuberculosis</i>	936_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	940_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	9484_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	9763_NT	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G01	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G02	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G03	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G04	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G05	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G06	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G07	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G08	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G09	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G10	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G100	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G101	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G102	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G103	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G104	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G105	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G106	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G107	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G108	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G109	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G11	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G110	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G111	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G112	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G113	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G113*	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G114	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G115	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G116	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G117	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G118	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G119	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G12	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G120	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G121	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G121*	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G122	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G123	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G124	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G125	IGiChP

<i>M. tuberculosis</i>	G126	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G127	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G128	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G129	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G13	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G130	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G131	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G132	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G133	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G134	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G135	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G136	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G137	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G138	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G139	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G14	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G140	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G141	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G142	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G143	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G144	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G145	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G146	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G147	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G148	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G149	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G15	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G150	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G151	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G152	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G153	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G154	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G155	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G156	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G157	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G158	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G159	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G16*	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G160	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G161	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G162	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G163	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G164	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G165	IGiChP

<i>M. tuberculosis</i>	G166	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G168	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G169	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G17	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G170	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G171	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G172	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G173	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G174	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G175	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G176	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G177	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G178	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G179	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G18	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G180	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G180*	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G181	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G182	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G183	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G184	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G185	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G186	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G187	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G188	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G189	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G19	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G190	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G191	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G192	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G193	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G194	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G195	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G196	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G197	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G198	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G199	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G20	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G200	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G201	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G202	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G203	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G204	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G205	IGiChP

<i>M. tuberculosis</i>	G206	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G207	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G208	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G209	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G21	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G210	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G211	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G212	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G213	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G214	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G215	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G216	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G217	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G218	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G219	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G22	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G220	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G221	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G222	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G223	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G224	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G225	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G226	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G227	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G228	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G229	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G23	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G230	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G231	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G232	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G233	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G234	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G235	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G236	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G237	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G238	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G239	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G24	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G240	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G241	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G242	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G25	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G26	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G27	IGiChP

<i>M. tuberculosis</i>	G28	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G29	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G30	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G31	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G32	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G33	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G34	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G342	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G343	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G344	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G35	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G36	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G37	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G38	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G39	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G40	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G41	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G42	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G43	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G44	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G45	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G46	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G47	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G48	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G49	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G50	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G51	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G52	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G53	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G54	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G56	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G57	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G58	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G59	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G60	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G61	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G62	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G63	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G64	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G65	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G66	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G67	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G68	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G69	IGiChP

<i>M. tuberculosis</i>	G70	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G71	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G72	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G73	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G74	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G75	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G76	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G77	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G78	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G79	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G80	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G81	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G82	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G83	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G84	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G86	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G87	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G88	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G89	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G90	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G91	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G92	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G93	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G94	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G95	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G96	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G97	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G98	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	G99	IGiChP
<i>M. tuberculosis</i>	L1/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L10/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L116	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L118/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L120/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L121	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L126/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L129/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L139	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L146/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L147/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L171/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L179/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L19/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L216/8	IBM PAN

<i>M. tuberculosis</i>	L218/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L230	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L232/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L237/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L253	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L275	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L301	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L306/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L307/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L317	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L319/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L321	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L34/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L386/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L404	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L41/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L412/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L428/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L48/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L490/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L50/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L507/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L513	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L54/8	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L549/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L550	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L564	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L565	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L567/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L571/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L601	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L65/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L674/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L690/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L696	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L704	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L723	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L724	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L725	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L80/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L84	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L9/7	IBM PAN
<i>M. tuberculosis</i>	L91/8	IBM PAN
