

### 新科技防疫： 全基因體定序技術於結核病群聚調查應用與實例

蕭聿昕、周如文\*

#### 摘要

結核病是空氣傳播傳染病，阻斷傳播鏈，為結核病防治極重要的關鍵。全球結核病防治已進入基因體分析的世代，透過全基因體定序(whole genome sequencing, WGS)獲得結核菌群的單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)資訊，可補強現有基因分型方法鑑別度的限制。緣此，為強化結核病聚集(cluster)事件監測效能及釐清可能的指標個案，本文敘述利用 WGS 進行親緣性分析，並整合疫情調查資料，訂定適用於臺灣群聚調查的 SNP 判定閾值： $\leq 5$  SNPs 為明確流病相關，為必要調查對象； $\leq 15$  SNPs 為極可能相關，視疫情可擴大疫調對象。並依資源及效益，建立群聚(outbreak)事件的實驗室檢驗流程：若由 MIRU-VNTR 初判為聚集且為特殊重要調查事件，則進行 WGS 分析。以提供疫情調查佐證，限縮所須疫調範圍，優化結核病聚集監測及群聚溯源，以落實精準結核病防疫的策略目標。

**關鍵字：**結核病、結核菌群、全基因體定序、聚集監測、群聚調查

#### 前言

結核病是空氣傳播的傳染病，係全球十大致死因之一；通常為臺灣法定傳染病中，每年確定數及死亡數最多的傳染病。根據 2020 年世界衛生組織(World Health Organization, WHO)結核病年報，2019 年全球約 1,000 萬人罹患結核病，造成約 140 萬人死亡[1]。而臺灣 2019 年結核病新案數為 8,732 人，發生率每十萬人口 37 人，造成 546 人死亡[2]。然而，距離「消除結核 2035 第二期國家計畫」的 2025 年須達每十萬人口 25 人發生率的目標仍有不小落差。為有效降低結核病發生率，

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：周如文\*

E-mail: rwj@cdc.gov.tw

投稿日期：2021 年 04 月 29 日

接受日期：2021 年 09 月 16 日

DOI: 10.6524/EB.202311\_39(21).0001

世界衛生組織建議可採取三項主要策略：及早發現病人、提供適當治療及阻斷結核病傳播。其中，阻斷傳播鏈因為必須依賴高階實驗技術提供的實證，需要持續引用新科技，以精進防疫作為。

結核病防治相關檢驗，需要持續精進各項傳統檢驗方法，並建置高階新科技診斷工具，例如次世代定序(next generation sequencing, NGS)技術及檢測流程。運用 NGS 可執行致病原全基因體定序(whole genome sequencing, WGS)。1998 年，首次藉 WGS 技術成功解碼結核菌群的全基因體。隨著國際間逐步落實 WGS 於例行結核病的鑑定與抗藥性檢測，並利用 WGS 分析，精準判定結核病傳播的網絡。反觀，現行傳統結核病聚集監測，所使用的間隔寡核酸分型法(space oligonucleotide typing, spoligotyping)及結核菌群最佳化散置重複單元(Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat, MIRU-VNTR)分型法，僅能分析 1%的結核菌群全基因體[3]，致使菌株間的鑑別程度受到限制，此可能造成與個案流行病學關聯無法吻合。至於 WGS 新科技，則可分析約 90%菌株的全基因體。

自 2010 年起，國際上逐漸運用 WGS 新技術，進行結核病傳播與聚集的調查研究[4]。藉由基因序列的單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)的改變，除可獲得不同菌株間基因上的 SNP 差異外，也可瞭解疾病傳播的空間方向性及時序性[5]，進而追蹤到指標個案(index case)或者是超級傳播者(super spreader)。

至於結核病聚集(cluster)的判定依據，國際上採行以合適的 SNP 差異數作為切點閾值。例如：加拿大(SNP ≤ 5)、澳洲(SNP ≤ 10)與英國(SNP ≤ 12)等國家，已利用 WGS 輔助結核病傳播調查，確認有助於掌握傳染來源及傳播途徑[6]。然而，因為結核菌株間 SNP 的差異數切點訂定是否合宜，強烈受到各國結核病盛行率、菌株世系(lineage)特性、抗藥性情況、宿主及環境等因素影響[7]。因此，至今全球尚未有判定結核病聚集的標準及共識。本研究為因應新科技防疫的趨勢及策略，針對一件由傳統基因分型方法判定的聚集，利用 WGS 親緣性分析及流行病學調查結果，嘗試訂定群聚(outbreak)判別的 SNP 差異數閾值，以提供公共衛生人員在調查個案間關聯性參考，協助確認感染源及阻斷疾病的傳播。

## 材料與方法

### 一、檢體菌株來源及檢體製備

分析由臨床實驗室送驗的結核菌群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)菌株。依照疾病管制署(以下簡稱疾管署)傳染病標準檢驗方法手冊規定[8]，先再次鑑定結核菌群菌株，次培養於 BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube 培養基進行增菌，再次培養於含 p-nitrobenzoic acid (PNB) 的 7H10 agar 及含 5%羊血的 BBL™ Columbia 瓊脂培養基，使用解剖顯微鏡檢確認為單一菌種。再將菌株經 80°C 去活化處理 1 小時後，提供基因分型實驗用。

## 二、藥物敏感性試驗

### (一) Middlebrook 7H11 瓊脂平板比例法

於生物安全第三級實驗室中，將新鮮培養的初代結核菌群，調製成濁度 McFarland 0.5–1.0 菌液後，稀釋接種至含抗生素的培養基。於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱中培養 3 週後，判讀抗藥結果。測試藥物品項如下：isoniazid (INH)、rifampicin (RIF)、ethambutol (EMB)、streptomycin (SM)、rifabutin (RFB)、fluoroquinolones (FQs) (含 moxifloxacin、levofloxacin)、kanamycin (KM)、amikacin (AMK)、capreomycin (CM)、ethionamide (ETO) 及 para-aminosalicylic acid (PAS) 等。

### (二) BACTECTM MGITM 960 Pyrazinamide (PZA)

取 2 管 PZA 培養管各加入 0.8 mL BACTECTM MGITM 960 PZA Supplement，加入 PZA 藥物溶液使種菌後藥物的濃度為 100 µg/mL。生長控制組試管不加任何藥物，由機器自動判讀結果。

## 三、分子抗藥性檢測

利用 Sanger 序列分析進行結核菌群分子抗藥性檢測，先以毛細管電泳確認 PCR 產物後進行定序。突變位點的判讀，係將測試菌株已完成定序的基因序列，與自 NCBI 資料庫下載 H37Rv 參考菌株與抗藥相關基因的序列，運用 Sequencher 及 MEGA 7 軟體進行比對。測試抗藥基因如下：INH (*katG*)、RMP (*rpoB*)、RFB (*rpoB*)、SM (*rpsL*) 及 PAS (*folC*)。

## 四、基因分型

### (一) 結核菌群間隔寡核酸分子分型法(spoligotyping)

利用結核菌群基因組之直接重複(direct repeat)片段，在不同菌株之間寡核苷酸不同，設計 43 種不同探針，針對不同菌株間此寡核苷酸之不同而進行菌株分型。以 PCR 方式，將寡核苷酸放大再與雜交膜上之探針相互雜交，最後經由化學冷光試劑反應激發產光，於底片曝光後偵測而完成分型。

### (二) 結核菌群最佳化散置重複單元分子分型法(MIRU-VNTR)

利用結核菌群染色體上 MIRU 及 VNTR 之位點在不同菌株可能具有不同序列重複數的多型性，以多重聚合酶連鎖反應(multiplex PCR)，將不同單元重複序列位點放大，依照估計出來的重複數，分別給予各位點一數字代碼。選用 10 個位點 MIRU(10)的單元重複數，組成一串數字代碼即為每個菌株的基因型。

### (三) 全基因體序列分析(WGS)

利用酚及氯仿萃取去活化結核菌群的核酸，後續以 TruSeq Paired End DNA, Gel free 試劑套組製備樣本文庫，並以 Illumina MiSeq 為平臺進行 WGS。定序資料利用 BioNumerics 套裝軟體進行全基因體組裝後，以 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 演算法分析菌株間 SNP 差異數，再使用 MEGA 7 軟體繪出親緣關係樹。

結核病聚集(cluster)：指當有 2 (含) 名以上確診結核病個案，且菌株間基因型別相同，但不一定具備人、時、地的關聯性。結核病群聚(outbreak)：指當有 2 (含) 名以上確診結核病個案，且菌株間基因型別相同，須具備人、時、地的關聯性，通報時間以間隔 1 年內 (含) 為原則，並具有流行病學關聯性。

## 五、疫調資料

個案基本資料、細菌學檢測結果及疫調資料，係由中央傳染病通報系統及疾管署結核病追蹤管理系統資料庫取得。

## 結果

### 一、事件個案說明

2007 年，花蓮縣某村落陸續通報 5 名多重抗藥性結核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)個案，初步疑似發生 MDR-TB 聚集事件。根據疫調資料，發現個案的活動地及時間皆高度重疊，具有流行病學關聯性，且傳統基因分型的結果皆為同一 Haarlem 3 型別，於是確認為群聚事件。時至 2017 年，仍持續新增具流行病學相關的 MDR-TB 確診個案。此一 MDR-TB 聚集事件歷時 12 年，共包含 23 名 MDR-TB 個案。23 名個案平均年齡為 41.2 歲；其中有 12 名(52.2%)男性；有 6 名(26.1%)胸部 X 光檢查結果為異常且有空洞 (表一)。

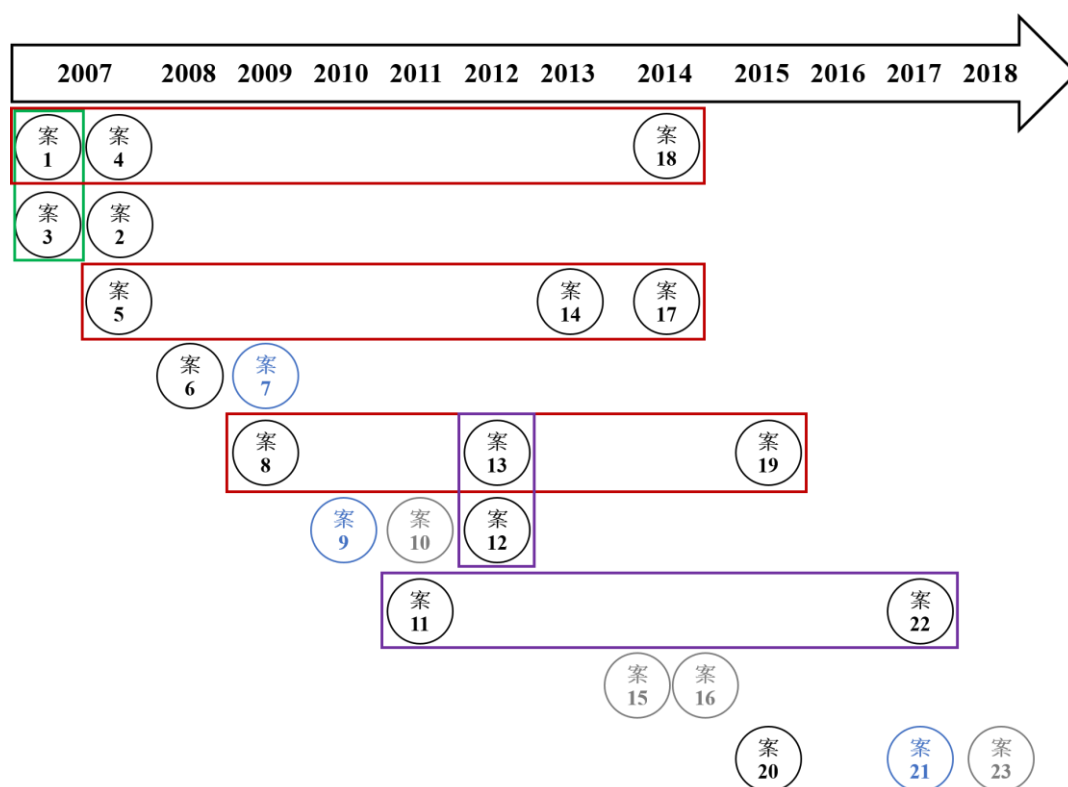
表一、2007–2018 年某結核病聚集事件個案特徵

個案編號	性別	年齡	胸部 X 光	塗片/培養	抗藥				
1	女	29	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
2	男	65	異常有空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
3	女	29	異常有空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	PAS
4	男	41	異常有空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	PAS
5	女	12	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
6	男	49	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
7	男	33	異常有空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	PAS
8	男	34	異常無空洞	—/+s	INH	RMP	RFB	SM	
9	女	44	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
10	女	35	異常無空洞	—/+	INH	RMP	RFB	SM	
11	女	51	異常有空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
12	男	23	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
13	男	27	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
14	男	33	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
15	女	86	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB		
16	女	48	異常有空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
17	女	53	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB	SM	
18	男	20	異常無空洞	—/+	INH	RMP	RFB	SM	
19	男	34	異常無空洞	—/+	INH	RMP	RFB	SM	
20	女	55	異常無空洞	+/+	INH	RMP	RFB		
21	男	58	異常無空洞	—/+	INH	RMP	RFB	SM	
22	女	55	異常無空洞	—/+	INH	RMP	RFB	SM	
23	男	34	異常無空洞	—/+	INH	RMP	RFB	SM	

\*+: 陽性；—: 陰性

事件主要發生的花蓮縣某村落，居民皆互動頻繁，彼此關係非常密切。推測造成社區聚集的傳播途徑，可能包括：空間上，家戶內傳染或與個案於日常生活接觸（例如：商業行為或休閒娛樂等）有關；時序上，指標個案為2007年2月通報的案1，與案3（2007年5月）互為職場同事，與居住於同一家戶的案4（2007年5月）為叔嫂及案18（2015年1月）為母女關係。案5（2007年5月）與案14（2013年3月）為表兄妹，分別為案17（2014年10月）的姪女及姪子。案8（2009年9月）、案13（2012年2月）與案19（2015年4月）為表兄弟關係。案12（2012年2月）與案13（2012年2月）偶爾會至村落的卡拉OK場所；而案11（2011年6月）與案22（2017年11月）為酒伴，有共同飲酒的朋友圈（圖一）。

另外，來自於花蓮縣但非居住於同一村落的三名個案（案7、案9及案21）。其中案9戶籍地設於該村落，推測過往可能與該事件村落居民，有直接或間接的接觸。案21則有酗酒習慣，無法排除與該村落的個案有共同暴露的可能，推測感染源與該村落有關。至於，居住於其他縣市的四名個案（案10、案15、案16及案23），根據現有疫調資料，尚無法釐清個案關聯性；但若依地緣性進行初判，則與主要聚集的個案可能無流行病學相關性（圖一）。



註：黑色圓為花蓮縣某村落個案，藍色圓為花蓮縣但非某村落個案，灰色圓為其他縣市個案；紅色方框為親戚，綠色方框為同事，紫色方框為休閒娛樂的朋友。

圖一、2007–2018年結核病聚集事件個案發病時序及關聯性

## 二、實驗室分析

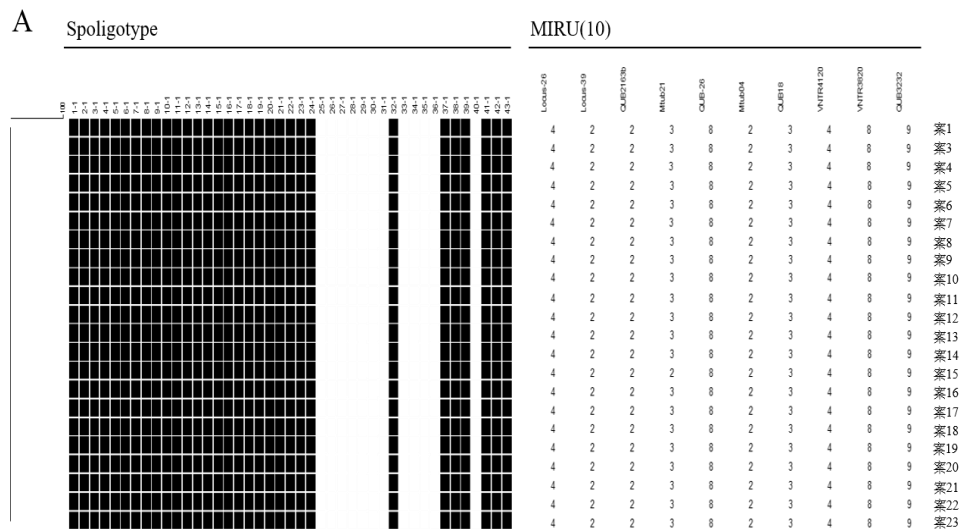
### (一) 細菌學結果

此 23 名個案的初次痰培養結果經鑑定皆為結核菌群。初次檢驗痰塗片抗酸菌顯微鏡檢查及痰結核菌群培養結果，皆為陽性者有 16 名(70%)，其中 11 名(69%)住於同一村落，顯示該村落具多名高傳染性個案，因而發展成為社區型聚集。藥物敏感性試驗結果顯示，皆 100%為 MDR-TB 個案（至少對 INH 及 RMP 抗藥）、100%對 RFB 抗藥及 91.3%對 SM 抗藥（除案 15 及案 20 外）。除案 3、案 4 及案 7 對 PAS 抗藥外，其他 20 名皆對其敏感。無對 FQs 及二線針劑抗藥，因此無超級抗藥結核病 (extensively drug-resistant TB, XDR-TB) 個案（表一）。分子抗藥性檢測結果顯示每位個案具有相同的 INH (*katG* S315T)、RMP (*rpoB* S450L)、RFB (*rpoB* S450L)、SM (*rpsL* K43R) 及 PAS (*folC* S150C) 抗藥相關基因突變位點。綜上，個案菌株間的傳統及分子藥敏檢測結果一致性高，初判可能具細菌學相關性。後續由於案 2 無法取得培養陽性的菌株，故僅有 22 名個案完成基因型分析。

### (二) 基因型分析結果

#### 1. Spoligotype 及 MIRU

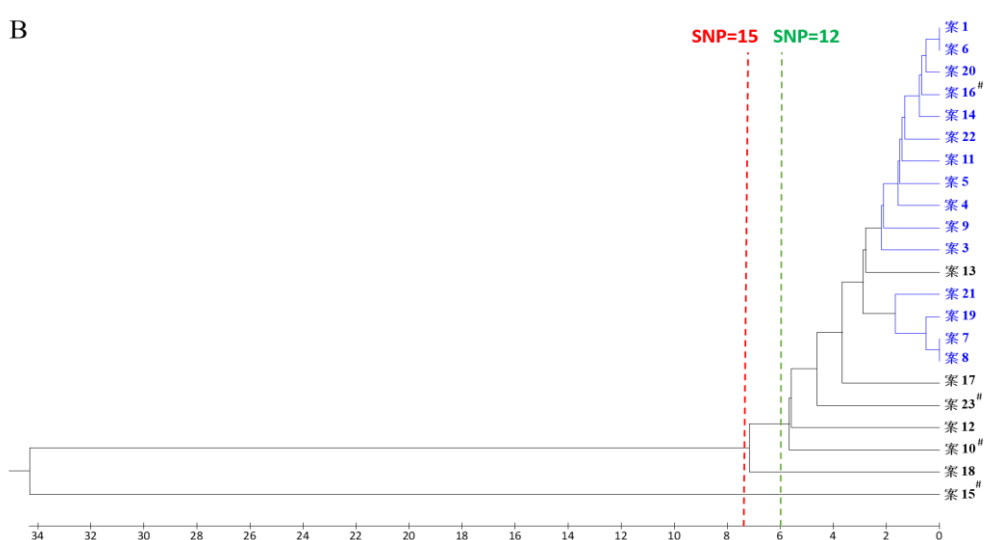
經比對國際 SpolDB4/SITVIT 資料庫，22 株菌株的 spoligotype 皆為 Harrlem 3 型，其 shared type (ST) 為 ST316。同時，以 MIRU(10) 分型，基因型別皆為 4-2-2-3-8-2-3-4-8-9。後續與疾管署分枝桿菌實驗室以 MIRU(10)、spoligotype 及／或 RFLP 方法建置的菌株基因型資料庫進行比對，發現該 22 株菌株可歸屬於同一聚集（圖二 A）。



#### 2. WGS

由 WGS 親緣性分析，發現 22 個案的菌株間共有 124 個 SNPs 差異數；菌株間 SNP 差異數最大為 69 及最小為 0（圖二 B）。

國際上較普遍採用 5 或 12 個 SNPs 區分個案是否具有流行病學關聯性，此聚集的菌株若以  $\leq 5$  SNPs 差異數為判定切點，則可將個案（藍色分支）匡列為同一社區群聚事件（圖二 B）；若以  $\leq 12$  SNPs 差異數為判定切點，參考個案流病關聯性資料，確認 17 名個案屬於同一群聚；但是，由於居住於同一家戶的案 17 與案 1、案 3 互為親戚關係，會因為菌株的 SNP 差異數=14 被排除於同一群聚。因此，若以  $\leq 12$  SNPs 差異數定義同一群聚，則會遺漏具明確流病關聯性的個案。進一步考量該聚集的個案所居住社區為結核病高風險地區、為 MDR-TB 聚集，且發病期程相差 12 年。因此，定義此聚集的 SNP 差異數閾值應為  $\leq 15$  為宜。



註：藍色分支表示  $\text{SNP} \leq 5$ ，綠色虛線表示  $\text{SNP} = 12$ ，紅色虛線表示  $\text{SNP} = 15$ 。

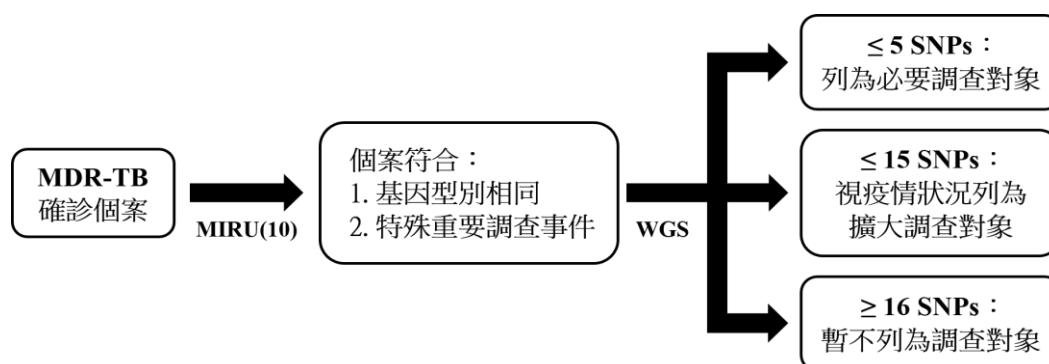
#表示根據現有疫調，尚無法釐清關聯性之個案

圖二、結核病聚集菌株基因分型結果：A. Spoligotype 及 MIRU-VNTR 基因分型結果；B. 結核病聚集親緣關係樹

綜合上述結果，定義出符合臺灣應用的群聚 SNP 差異數判定閾值： $\leq 5$  SNPs 差異數閾值，為明確相關個案。 $\leq 15$  SNPs 差異數閾值，為極可能相關個案。

### 三、臺灣結核菌群基因分型流程

雖然 WGS 在基因型監測上具相當實績，但是經考量資源、效益及時效性，建議更新結核病聚集基因分型流程（圖三），以 MIRU(10)為初級分型，若 MDR-TB 個案菌株基因型別相同，且為特殊重要調查事件，則進行 WGS 分析，進一步釐清親緣性。提供報告說明： $\leq 5$  SNPs 為明確流病相關，為必要調查對象； $\leq 15$  SNPs 為極可能相關，視疫情可擴大疫調對象； $\geq 16$  SNPs 則依相關事證考慮後續作為。



圖三、結核菌群基因分型流程判別結核病聚集的實驗室分析流程

## 討論

近年來基因定序技術日新月異，使基因體學(genomics)蓬勃發展，已順利運用到精準醫療及疫病防治上，尤其是藉由 NGS 技術提供結核菌群的全基因體訊息，為結核病防治提供新的方向，對快速檢測工具、新藥物開發、抗藥性預測、基因型監測及聚集事件調查等有莫大助益。然而，WGS 分析雖於抗藥性預測日趨成熟，2018 年 WHO 也出版相關參考文件[9]。對於結核病傳播的實務運用則方興未艾，標準化更形複雜，尚缺乏全球共識[10]。本研究已確認聚集個案菌株親緣判別的 SNP 切點數目，並訂定結核菌群 WGS 標準化的分析流程。

選擇已由 spoligotyping 及 MIRU-VNTR 判定的結核病聚集，因為方法學的設計個案間菌株的鑑別力相對受到限制。遂進階以 WGS 分析，發現案 15 與指標案 1 的菌株 SNP 差異數為 69，差異數過大而確定由原聚集排除。由德國的研究比較 IS6110 DNA 指紋(fingerprint)、MIRU-VNTR 及 WGS 三種方法預測個案間菌株的親緣關聯性，無例外以 WGS 的表現最佳，敏感度將近 100%、準確度為 81%，但是特異度則僅有 74%。因此，仍需要整合流行病學或疫調資料，共同研判是否確實為群聚事件才適當[11]。

其實，菌株親緣性的分析，最適合的 SNP 差異數切點，會受到不同因素影響而變動。現有研究顯示：以結核病盛行率而言，在低盛行率的區域以 SNP 差異數  $\leq 5$  作為群聚感染判定，中盛行率則以 SNP 差異數  $\leq 12$  作為切點，而高盛行率的地區（國家）則需要用 20 個 SNP 以上的差異數[12]。再者，菌株的演化率也會影響 SNP 差異數切點，文獻指出每年每個基因組的遺傳變異率為 0.3–0.5 SNPs，會造成基因體序列變異的累積。估計 3 年時最大遺傳變異數為 5 個 SNP，10 年時最大遺傳變異數為 10 個 SNP [13]，故亦須納入考量個案先後的發病時程。由於治療用藥會造成菌株因為壓力而產生抗藥性，已知有些抗藥基因的特定突變與結核病傳播密切相關[14]。另外，宿主與環境因素亦皆會影響 SNP 差異數切點之訂定。本研究藉由 WGS 探討一件歷時 12 年的 MDR-TB 聚集，定義臺灣結核菌株的親緣性，除可以供匡列可能的聚集，以監測未明的可能結核病傳播事件外，更提供群聚事件調查的精準判定依據：SNP 差異數  $\leq 5$  為明確相關個案，及  $\leq 15$  為



極可能相關個案。另，透過精確聚集關聯初判，再導入疑似群聚疫情調查中，可縮小調查範圍，避免不必要的資源浪費及人力負擔。

緣此，由於臺灣抗藥性結核病以新案居多、聚集菌株持續增長及若干群聚事件延續多年，個案發病時間不一及空間遷移等因素，造成疫調難度高，傳播鏈無法釐清。疾管署實驗室優先執行 MDR-TB 個案的 WGS 分析。並自 2021 年 1 月開始，疾管署參考實驗室更新疑似群聚事件的基因分型流程，先以 MIRU(10)為初級分型，相同基因型聚集將視關鍵性，接續提供 WGS 進階分型報告。WGS 以更高解析特性來區別菌株間親緣關聯性，建構更精確的傳播網絡，優化結核病聚集監測及群聚溯源，以有效確認感染源及控制疾病的傳播。然而，儘管 WGS 技術的蓬勃發展，其所需成本理應持續下降，但仍然相對昂貴，成為 WGS 是否能被廣泛應用的限制因素之一。另外，實驗室軟、硬體的維護及升級成本，生物資訊相關人才養成等亦須納入考量。未來期能利用 WGS 分析取代結核病傳統抗藥性檢驗，以提供精準個人化醫療；最佳化群聚的匡列，以釐清潛在尚未揭露的傳播或群聚等。相信廣於運用 WGS 新科技工具於防疫，有利於邁向消除結核病終極目標。

### 參考文獻

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>.
2. 衛生福利部疾病管制署：臺灣結核病防治年報 2019。取自：<https://www.cdc.gov.tw/File/Get/eohpjs5F-9obJG4sMlmHBw>。
3. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, et al. Current Methods in the Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 645802.
4. van der Werf MJ, Ködmön C. Whole-Genome Sequencing as Tool for Investigating International Tuberculosis Outbreaks: A Systematic Review. *Front Public Health* 2019; 7: 87.
5. Meehan CJ, Moris P, Kohl TA, et al. The relationship between transmission time and clustering methods in *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. *EBioMedicine* 2018; 37: 410–6.
6. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(2): 137–46.
7. Lalor MK, Casali N, Walker TM, et al. The use of whole-genome sequencing in cluster investigation of a multidrug-resistant tuberculosis outbreak. *Eur Respir J* 2018; 51(6): 1702313.
8. 衛生福利部疾病管制署：傳染病標準檢驗方法手冊。取自：<https://www.cdc.gov.tw/File/Get/Icq-IqB57bJpe-Mv3QDdDQ>。

9. World Health Organization. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274443/WHO-CDS-TB-2018.19-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
10. Hatherell HA, Colijn C, Stagg HR, et al. Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: a systematic review. *BMC Med* 2016; 14: 21.
11. Diel R, Kohl TA, Maurer FP, et al. Accuracy of whole-genome sequencing to determine recent tuberculosis transmission: an 11-year population-based study in Hamburg, Germany. *Eur Respir J* 2019; 54: 1901154.
12. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17: 533–45.
13. Ford CB, Lin PL, Chase MR, et al. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet* 2011; 43: 482–6.
14. Nikolayevskyy V, Niemann S, Anthony R, et al. Role and value of whole genome sequencing in studying tuberculosis transmission. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25: 1377–82.