

ZNAČENJE LABORATORIJSKIH PODATAKA U NADZORU NAD TUBERKULOZOM U MEĐIMURSKOJ ŽUPANIJU

MARINA PAYERL-PAL, VERA KATALINIĆ-JANKOVIĆ,¹ MIHAELA OBROVAC,¹
VESNA VRŠIĆ KRIŠTOFIĆ, BISERKA POJE JELENIĆ i MARIJANA ZADRAVEC

Zavod za javno zdravstvo Međimurske županije, Čakovec i ¹Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

Mikrobiološka dijagnostika tuberkuloze temeljna je točka svakog nacionalnog programa za kontrolu tuberkuloze. U Međimurskoj županiji je godišnja incidencija na razini prosjeka Hrvatske, osim u 2009. godini kada je u Međimurskoj županiji iznosila 23/100.000 naspram 19/100.000 u Hrvatskoj. Cilj ovoga rada bio je analizirati laboratorijske rezultate (po dobi, spolu, osjetljivosti, genotipu) u kontroli tuberkuloze u Međimurskoj županiji. Na Odjelu za dijagnostiku tuberkuloze Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo – na nacionalnoj razini provodi se prospektivna studija genotipizacije izolata *Mycobacterium tuberculosis*. Kao molekularna metoda za genotipizaciju članova *M. tuberculosis* kompleksa koristi se metoda MIRU-VNTR (engl. *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*, MIRU; *Variable Number of Tandem Repeats*, VNTR). U razdoblju od 2007. do 2009. godine tipizirano je ukupno 59 sojeva bolesnika iz Međimurske županije, od kojih je 27 (45,8%) jedinstvenog genotipa, a 32 (54,2%) je raspodijeljeno u ukupno 22 klastera (2 ili više sojeva identičnog genotipa) s brojem pripadajućih sojeva od 2 do 22. Od ukupno 22, dva klastera čine sojevi izolirani isključivo u Međimurskoj županiji. Osim što su ti sojevi karakteristični za Županiju, bolesnici u kojih su izolirani najvjerojatnije pripadaju istim putevima prijenosa. Ostalih 25 sojeva u klasterima je raspodijeljeno u ukupno 20 klastera, pri čemu su ostali sojevi izolirani u bolesnika koji dolaze iz drugih županija. Relativno visoki postotak sojeva jedinstvenog genotipa ukazuje da je stupanj nedavnog prijenosa bolesti relativno nizak. Rezultati molekularne epidemiologije ukazuju na učinkovitost protuepidemijskih mjera otkrivanjem neočekivanih puteva prijenosa, identificiranjem sojeva koji su prisutni u određenoj zajednici i imaju veću mogućnost izazivanja bolesti.

Ključne riječi: tuberkuloza, molekularna epidemiologija, Međimurska županija

Adresa za dopisivanje: Marina Payerl-Pal, dr. med.
Zavod za javno zdravstvo Međimurske županije
Ivana Gorana Kovačića 1e
40000 Čakovec, Hrvatska
Tel: 040 311 790; faks: 040 310 338
E-pošta: marina.payerl-pal@zzjz-ck.hr

UVOD

Tuberkuloza je danas još uvijek vodeći uzročnik morbiditeta i mortaliteta od zaraznih bolesti u svijetu. Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), u 2008. godini u svijetu je 9,4 milijuna ljudi oboljelo, a gotovo 1,4 milijuna umrlo od tuberkuloze, najsmrtonosnije izlječive bakterijske bolesti. Procjenjuje se da je trećina svjetskog stanovništva ili 2 milijarde ljudi zaraženo s *Mycobacterium (M.) tuberculosis* što predstavlja mogući izvor novih infekcija (1). Mikrobiološki laboratoriji i njihova uloga u dijagnostici tuberkuloze temeljni su dio svakog nacionalnog programa za kontrolu tuberkuloze. Uz konvencionalnu dijagnostiku, prijenos i nadzor nad širenjem *M. tuberculosis* u populaciji revolucionirala

je genotipizacija izoliranih sojeva. Primjena molekularne epidemiologije u kombinaciji sa standardnom deskriptivnom epidemiologijom u kontroli tuberkuloze put je prema njoj eliminaciji.

Molekularna epidemiologija u kontroli tuberkuloze

Molekularna epidemiologija je moćno oruđe za praćenje zaraznih bolesti (2). Definira se kao znanost koja omogućava razumijevanje prijenosa, patogeneze i etiologiju bolesti u ljudskoj populaciji. Na osnovi te definicije, korištenje molekularne epidemiologije u proučavanju zaraznih bolesti omogućuje procjenu veze čimbenika rizika s prijenosom bolesti, otkrivanje i potvrdu mikroepidemija unutar institucija, otkrivanje sojeva od javnozdravstvenog

značenja; u slučaju tuberkuloze, razlikovanje između reaktivacije bolesti i reinfekcije, razumijevanje virulencije i mehanizma rezistencije različitih sojeva, unaprjeđivanje saznanja o dinamici prijenosa i širenju zaraznih bolesti te razvoj strategija za liječenje i prevenciju bolesti (3,4). Većina istraživača pritom definira klastere (dva ili više sojeva identičnih genotipa) kao epidemiološki povezane karike lanca nedavnog prijenosa bolesti, a izolate jedinstvenog genotipa kao slučajeve reaktivacije prethodno preboljele bolesti (5). Među brojnim molekularnim metodama za genotipizaciju članova *M. tuberculosis* kompleksa ističe se metoda MIRU-VNTR (engl. *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*, MIRU; *Variable Number of Tandem Repeats*, VNTR) koja je zbog jednostavnosti izvođenja i reproducibilnosti izuzetno prikladna za globalno epidemiološko praćenje tuberkuloze (6-8). Tipizacija određivanjem broja tandemskih ponavljanja zasniva se na analizi genetskih elemenata koji sadrže ponovljene slijedove čiji broj kopija varira među različitim sojevima. MIRU su tandemski ponovljeni slijedovi nukleotida smješteni u intergenskim regijama unutar genoma *M. tuberculosis*. Ciljni dijelovi slijeda nukleotida umnože se lančanom reakcijom polimerazom, a veličina produkata odredi se usporedbom s DNK - biljezima molekularne mase. Od 2006. godine preporučena metoda za genotipizaciju sojeva *M. tuberculosis* je metoda MIRU-VNTR koja uključuje određivanje veličine ukupno 24 lokusa, pri čemu 15 lokusa čini diskriminatorski set (lokusi 580, 960, 1644, 2996, 3192, 802, 424, 577, 1955, 2163b, 2165, 2401, 3690, 4052 i 4156), a dodatni set čini još 9 lokusa (lokusi 154, 2059, 2531, 2687, 3007, 4348, 2347, 2461 i 3171) (8). Rezultat genotipizacije je 15-člani, ili uz dodatne lokuse 24-člani, numerički kod koji je prikladan za inter- i intralaboratorijsko uspoređivanje kliničkih izolata *M. tuberculosis*.

Od lipnja 2005. godine na Odjelu za dijagnostiku tuberkuloze Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) u Zagrebu provodi se prospektivna studija genotipizacije sojeva *M. tuberculosis* kompleksa izoliranih u svih novooboljelih bolesnika u Hrvatskoj. Isprva se za genotipizaciju koristio set od 12 MIRU lokusa, a 2006. god. predstavljeni su diskriminatorski setovi od 15 i 24 (set od 15 uz dodatnih 9 lokusa) MIRU lokusa, pri čemu je set od 15 MIRU lokusa dovoljan za epidemiološko praćenje, dok se čitavi set koristi za filogenetske analize (8). Unosom rezultata genotipizacije u mrežnu bazu podataka MIRU-VNTR plus moguće je usporediti dobivene podatke s referentnim sojevima u bazi (9).

Korištenjem seta od 12 lokusa u razdoblju od lipnja 2005. do siječnja 2007. genotipizirano je ukupno 1600 sojeva *M. tuberculosis*. Od siječnja 2007. god. za tipizaciju se koristi set od 15 lokusa te je na taj način do srpnja 2010. tipizirano dodatnih 2700 sojeva. Kako je set od 15 lokusa znatno diskriminatorsniji od seta od 12 lokusa, za ovo su istraživanje uzeti samo rezultati dobiveni tim setom.

Rezistencija na antituberkulotske lijekove

Prvu liniju antituberkulotskih lijekova (ATL) čine izoniazid (INH), rifampicin (RIF), streptomycin (STR), etambutol (EMB) i pirazinamid (PZA). Smatra se da bolesnik ima rezistentnu tuberkulozu ako je izolirani soj rezistentan na jedan od tih lijekova. Epidemiološki se rezistentna tuberkuloza dijeli u tri tipa: primarna - rezistentna tuberkuloza u bolesnika koji nije nikad prethodno uzimao ATL, stečena - rezistentna tuberkuloza u bolesnika koji je na početku bolesti imao osjetljive bacile, a tijekom terapije se razvila rezistencija te inicijalna - rezistentna tuberkuloza u bolesnika kod kojeg se ne može sa sigurnošću utvrditi je li prethodno uzimao ATL ili ne (10). Rezistencija na ATL u sojeva *M. tuberculosis* nastaje zbog spontanijih mutacija u specifičnim regijama gena za koje je poznato da uzrokuju rezistenciju. Oko 96% sojeva rezistentnih na RIF imaju mutaciju u genu *rpoB*, a rezistencija na INH povezana je s brojnim mutacijama koje pogađaju jedan ili više gena od kojih su najznačajniji *katG* i *inhA*. U Hrvatskoj je za rezistenciju na INH bilo moguće odrediti genetsku osnovu za 76% ispitivanih sojeva na ispitivanom uzorku od 103 soja rezistentna na INH - u 58,3% slučajeva rezistencija je nastala kao posljedica mutacije u genu *katG*, a u 15,5% u genu *inhA* (11).

Hrvatska se ubraja u zemlje sa srednjom incidencijom tuberkuloze (stopa od 22,9 bolesnika na 100.000 stanovnika u 2008. godini). Trend pada incidencije tuberkuloze u proteklih desetak godina u Hrvatskoj prati i trend u Međimurskoj županiji koja prema popisu iz 2001. godine broji 118.426 stanovnika. U 2008. godini incidencija tuberkuloze u Hrvatskoj iznosila je 23,9/100.000, a u 2009. godini po prvi puta je bila ispod 20/100.000. Međutim, u Međimurskoj županiji je silazni trend u promatranom razdoblju bio sporiji pa je zabilježena incidencija od 21,9/100.000 još uvijek bila iznad prosjeka Hrvatske.

Cilj ovoga rada bio je analizirati laboratorijske rezultate u Međimurskoj županiji. Prikazani su poda-

ci o incidenciji tuberkuloze, dobi i spolu oboljelih te sijelu bolesti, kao i rezistenciji na antituberkulotske lijekove (ATL). Poseban naglasak stavljen je na rezultate genotipizacije sojeva *M. tuberculosis* izoliranih u Mikrobiološkom laboratoriju u Čakovcu u bolesnika iz Međimurske županije u razdoblju od 2007. godine do 2009. godine.

ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

U ovom su radu korišteni podaci iz arhive Mikrobiološkog laboratorija Zavoda za javno zdravstvo (ZZJZ) Međimurske županije te Odjela za dijagnostiku tuberkuloze HZJZ.

Ispitanici

U razdoblju od 2007. do 2009. godine obrađeno je 59 sojeva *M. tuberculosis* koji su izolirani u bolesnika iz Međimurske županije, pri čemu je za svakog bolesnika u obradu uzet samo jedan izolat. Prosječna dob bolesnika bila je 66 godina, pri čemu je najstariji bolesnik u vrijeme izolacije soja imao 93 godine, a najmlađi 28 godina; 40 sojeva je izolirano od osoba muškog spola s medijanom godina 51 te od 19 žena s medijanom godina 76.

Izolacija i karakterizacija *M. tuberculosis*

U dijagnostici tuberkuloze u Mikrobiološkom laboratoriju ZZJZ Međimurske županije koriste se standardni postupci obrade uzoraka na tuberkulozu: bojenje po Ziehl-Neelsenu te kultivacija uzorka na krutoj hranjivoj podlozi Loewenstein-Jensen. Kod metode po Ziehl-Neelsenu, uzročnik je obojen karbol-fuksinom. Kontrast se dobije dodatnim bojenjem metilen-plavim ili nekom drugom bojom. Acidorezistentne mikobakterije biti će ružičasto obojene na plavoj pozadini. U posljednjih osam godina uvedena je tekuća podloga u dijagnostiku (engl. *Mycobacterium Growth Indicator Tube*, MGIT). Svaki primoizolat acidorezistentnih mikobakterija šalje se na Odjel za dijagnostiku tuberkuloze HZJZ-a na postupak identifikacije, određivanje osjetljivosti na ATL te molekularnu tipizaciju metodom MIRU-VNTR.

Ispitivanje osjetljivosti *M. tuberculosis* na ATL

Ispitivanje osjetljivosti na ATL moguće je provesti fenotipskim metodama na krutim ili tekućim podlogama te molekularnim metodama.

Fenotipska metoda

Na Odjelu za dijagnostiku tuberkuloze HZJZ-a za

ispitivanje osjetljivosti *M. tuberculosis* na ATL koristi se konvencionalna metoda proporcije po Cannettiju na hranjivoj podlozi Loewenstein-Jensen. Svi pozitivni izolati testiraju se na INH, RIF, STR, EMB i PZA.

Molekularne metode

DNK *M. tuberculosis* izolirana je korištenjem komercijalnog kita, Qiaamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) po protokolu za Gram-pozitivne bakterije, prema uputama proizvođača. Molekularne metode ispitivanja osjetljivosti na RIF i INH uključuju određivanje specifičnih mutacija u genu *rpoB* odgovornih za rezistenciju na RIF, a u genima *katG* i *inhA* za rezistenciju na INH. Za određivanje mutacija koriste se komercijalni test GenoType MTB-DR+ (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Njemačka) prema uputama proizvođača i *in house* metoda višestruke lančane reakcije polimerazom uz korištenje specifičnih početnica (12).

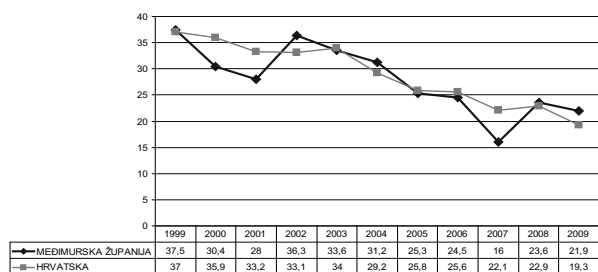
Genotipizacija *M. tuberculosis* metodom MIRU-VNTR

Postupak izolacije DNK istovjetan je postupku koji se koristi za molekularno određivanje osjetljivosti na ATL. Genotipizacija sojeva *M. tuberculosis* provodi se metodom MIRU-VNTR (engl. *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*, MIRU; *Variable Number of Tandem Repeats*, VNTR). Koriste se specifične početnice da bi se lančanom reakcijom polimerazom umnožili dijelova genoma koji sadrže jedinice promjenjivog broja ponavljanja. Produkti umnožavanja i DNK-biljezi nanose se na gel agaroze i razdvoje se prema veličini elektroforezom na gelu agaroze. Broj ponavljanja ciljnih jedinica odredi se uvidom u tablice alela nakon usporedbe s DNK-biljezima (6,7).

REZULTATI

Tuberkuloza u Međimurskoj županiji

U incidenciji tuberkuloze u Međimurskoj županiji od 1999. do 2009. godine može se uočiti silazni trend. S obzirom na sporiju dinamiku pada u odnosu na Hrvatsku, zabilježena incidencija od 21,9/100.000 još uvijek je iznad prosjeka Hrvatske (sl. 1.). Tijekom promatranog razdoblja u Međimurskoj županiji tuberkuloza je bakteriološki potvrđena u 78-93% bolesnika, dok je u isto vrijeme prosjek bakteriološki potvrđene tuberkuloze za Hrvatsku iznosio približno 75%.



Sl. 1. Incidencija tuberkuloze u Međimurskoj županiji i Hrvatskoj od 1999. do 2009. godine

Raspodjela bolesnika prema dobi, spolu i sijelu bolesti

Obolijevanje od tuberkuloze najčešće je u radno-aktivnoj skupini bolesnika u dobnom rasponu od 41 do 50 godina te u rasponu od 51 do 60 godina. U 2004. godini, iznimno u odnosu na ostale godine, bilježi se najveći broj oboljelih u dobnoj skupini od 31 do 40 godina. Tuberkuloza je rijetka u dječjoj dobi i u mladih do 20 godina, a u posljednjih pet godina *M. tuberculosis* nije izoliran iz kliničkih uzoraka te populacije. U dobi iznad 60 godina tuberkuloza je prisutna, a češće se otkrije tijekom dijagnostičke obrade zbog sumnje na neku drugu bolest ili povredu.

Tuberkuloza je značajno češće bolest muškog spola. U promatranom razdoblju udio oboljelih muškaraca kreće se od 61% do 83%. U posljednje dvije godine muškarci čine dvije trećine oboljelih.

Izvanplućna tuberkuloza je rijetko sjelo bolesti. U promatranom razdoblju u deset bolesnika dokazana je urogenitalna tuberkuloza. U jednakog je broja bolesnika dokazana limfoglandularna tuberkuloza, dok je osteoartikularna tuberkuloza dijagnosticirana u petero bolesnika. Najrjeđa je pleuralna tuberkuloza sa svega troje oboljelih.

U tablici 1 izneseni su podaci o broju bolesnika i profilu rezistencije sojeva rezistentnih na ATL iz Međimurske županije u razdoblju od 1999. do 2009. godine identificiranih metodom proporcije po Canettiju. U promatranom razdoblju identificirano je 20 sojeva *M. tuberculosis* rezistentnih na ATL, čime udio rezistentne tuberkuloze iznosi 6,6%. Najčešće je utvrđena rezistencija na STR (7 sojeva) te kombinaciju STR i INH (10 sojeva), dok je u jednog soja utvrđena rezistencija na STR, INH i RIF.

Tablica 1.

Sojevi rezistentni na antituberkulotike utvrđeni konvencionalnom metodom proporcije po Canettiju izolirani u Međimurskoj županiji od 1999. do 2009. godine

	1999.	2000.	2001.	2002.	2003.	2004.	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.
STR	1	1	1	1	1					1	1
INH					1						1
STR+INH	3	1	2			1		1	2		
STR+INH+RIF			1								
Ukupno	4	2	4	1	2	1	0	1	2	1	2

INH: izoniazid; RIF: rifampicin; STR: streptomycin

Rezultati genotipizacije

Od 2007. do 2009. godine tipizirano je 59 sojeva izoliranih u bolesnika iz Međimurske županije. Ukupno 27 (45,8%) sojeva jedinstvenog je genotipa u nacionalnoj bazi podataka. Prosječna dob tih bolesnika je 66 godina, pri čemu je najstariji bolesnik u vrijeme izolacije analiziranog soja imao 93 godine, a najmlađi 28 godina. Ostalih 32 (54,2%) soja raspodijeljena su u ukupno 22 klastera s brojem pripadajućih sojeva od 2 do 22. Nije bilo zabilježenog prijenosa rezistentnih sojeva unutar Međimurske županije. Od ukupno 22, dva klastera - jedan sa 2 člana, a drugi

sa 5 članova čine sojevi izolirani isključivo u Međimurskoj županiji (tablica 3). Ostalih 25 sojeva u klasterima je raspodijeljeno u ukupno 20 klastera od kojih je jedan ili više sojeva izoliran u bolesnika iz Međimurske županije, a ostali sojevi iz neke druge ili drugih županija.

Klasteri karakteristični za Međimursku županiju

Kako su klasteri u kojima su isključivo sojevi bolesnika iz Međimurske županije time i karakteristični za tu županiju, u ovom će radu biti detaljnije analizirani samo ti klasteri. Usporedbom tih sojeva s re-

Tablica 2.

Genotipovi sojeva u klasteru 1 i klasteru 2 dobiveni metodom MIRU-VNTR

Lokus	MIRU-VNTR lokusi														
	580	960	1644	2996	3192	802	424	577	1955	2163b	2165	2401	3690	4052	4156
Klaster 1	2	5	3	5	3	5	2	3	3	4	3	4	3	7	3
Klaster 2	2	3	2	5	3	2	2	2	2	2	2	2	3	5	2

Tablica 3.

Karakteristike bolesnika čiji su sojevi u klasterima 1 i 2

Bolesnik	Datum izolacije <i>M.tuberculosis</i>	Spol	Lokacija	Pušenje	Alkoholizam	Posebna karakteristika
Klaster 1						
Bolesnik 1	8.mj./2005. 2.mj./2006.*	M	Mjesto A	DA	DA	psihijatrijski bolesnik
Bolesnik 2	2.mj./2007.	M	Mjesto B	DA	?	romska zajednica
Bolesnik 3	12.mj./2003. 11.mj./2007.*	M	Mjesto B	DA	DA	romska zajednica
Bolesnik 4	11.mj./2000. 7.mj./2009.*	Ž	Mjesto B	DA	?	romska zajednica
Bolesnik 5	nema podataka	Ž	Mjesto C	NE	NE	zdravstveni radnik
Klaster 2						
Bolesnik 1	10.mj./2006.	M	Mjesto D	DA	DA	
Bolesnik 2	1.mj./1996. 4.mj./1999. 12.mj./2006.*	M	Mjesto E	DA	DA	maligna bolest

* Za bolesnike koji imaju višestruke izolate *M. tuberculosis* za genotipizaciju je odabran samo 1 izolat

ferentnim sojevima u Međunarodnoj bazi podataka MIRU-VNTR_{plus} nisu pronađeni sojevi koji bi bili identični promatranim sojevima.

Klaster sa 5 članova. U klasteru s pet bolesnika, tri su bolesnika pripadnici iste zajednice, iz istog su mjesta, ali nisu obiteljski povezani. Nema očite poveznice između tih triju bolesnika i ostala dva bolesnika čiji su sojevi dio tog klastera. Prijenos bolesti na jednu od tih osoba (bolesnik pod br. 5) moguće je objasniti kontaktom na radnom mjestu zbog mogućeg višestrukog kontakta s ostalim pripadnicima klastera (tablica 3). U ovom slučaju dodatna vrijednost rezultata genotipizacije je očita. Bez podatka o istom genotipu, kod te se osobe taj kontakt nije mogao pretpostaviti što je direktni doprinos laboratorijskih podataka i molekularne epidemiologije kontroli bolesti. Svih pet izoliranih sojeva *M. tuberculosis* osjetljivi su na prvu liniju ATL i nisu razvili otpornost tijekom liječenja.

Klaster sa 2 člana. U klasteru s dva člana zabilježeno samo u Međimurskoj županiji prema dostupnim podacima nije bilo moguće utvrditi povezni-

cu i objasniti nedavni prijenos bolesti (tablica 3). To upućuje na potrebu dodatnog istraživanja mogućnosti prijenosa. I ovdje su izolirani sojevi *M. tuberculosis* bili osjetljivi na prvu liniju ATL i nisu razvili otpornost tijekom liječenja.

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

U Mikrobiološkom se laboratoriju ZJZ Međimurske županije godišnje pregleda do 2000 uzoraka na tuberkulozu te uz vrlo visok postotak bakteriološki potvrđene tuberkuloze (78-93%) zadovoljava potrebe za tom vrstom dijagnostike u svojoj županiji. U Međimurskoj županiji u razdoblju od 1999. do 2009. godine među oboljelima od tuberkuloze prevladava dobna skupina radno aktivnog stanovništva uz očekivanu veću zastupljenost bolesnika muškog spola. Rezultati ispitivanja osjetljivosti sojeva *M. tuberculosis* su povoljni, udio rezistentne (6,6%), kao i multirezistentne tuberkuloze (0,3%) je nizak. Ukupan broj bolesnika s rezistentnom tuberkulozom je nizak, a u promatranom razdoblju zabilježen je

samo jedan bolesnik s multirezistentnom tuberkulozom (rezistencija na INH i RIF s rezistencijom ili bez rezistencije na druge ATL) (tablica 1).

Genotipizacija sojeva *M. tuberculosis* pružila je novi pogled u širenje tuberkuloze u populaciji. Studije koje uključuju klasičnu i molekularnu epidemiologiju potvrdile su očekivane, ali isto tako otkrile i neočekivane puteve prijenosa bolesti. To je ukazalo na postojeće slabosti današnjih mjera primijenjenih u kontroli tuberkuloze. Osnovna postavka molekularne epidemiologije je pretpostavka da su dvije osobe čiji izolati imaju isti genotip bile povezane direktno ili indirektno u lancu prijenosa bolesti. Sojevi s identičnim genotipom otkriveni unutar dvije godine ubrajaju se u klaster. Pokazalo se da je samo od 5% do 10% klastera identificirano u istraživanjima obuhvatom kontakata (13,14).

Populacijske studije su pokazale da se *M. tuberculosis* ne širi brzo, a prijenos preko geografskih barijera je otežan. Učinkovite protutuberkulozne mjere treba stoga ciljano usmjeriti na određena ograničena područja. Ipak, postoje neki sojevi *M. tuberculosis* koji su se vremenom proširili na veća geografska područja. To se posebno odnosi na sojeve iz obitelji Beijing, obitelji koja je prvotno identificirana na području istočne Azije, a danas je rasprostranjena i na području Ruske federacije te Baltičkih republika. Tako je 2007. godine po prvi puta u Hrvatskoj izoliran soj iz te obitelji, upravo u Međimurskoj županiji. Soj je identificiran kao pripadnik Beijing obitelji na osnovi usporedbe s referentnim sojevima u međunarodnoj bazi podataka MIRU-VNTR_{plus} (9). U odgovoru na pitanje predstavlja li slučaj u klasteru nedavni prijenos tuberkuloze, dodatnom analizom klastera pokazalo se da je u 86% klastera dokazana epidemiološka veza koja upućuje da se dogodio nedavni prijenos bolesti. Isto tako kod nekih članova klastera nije bilo moguće utvrditi da se nedavni prijenos bolesti stvarno i dogodio, kao što je slučaj i s klasterom 2 iz Međimurske županije (15). U zemljama s niskom incidencijom tuberkuloze broj sekundarnih slučajeva bolesti može se kontrolirati i otkriti ranijim obuhvatom i obradom kontakata (14). Smatra se da je postojanje klastera znak upozorenja za dodatno epidemiološko istraživanje, jer se može pretpostaviti da bolesnici čiji su sojevi u klasteru predstavljaju karike u lancu prijenosa (16). U Međimurskoj županiji u razdoblju od 2007. do 2009. godine udio sojeva u klasterima je 54,2%, što je povoljnije od rezultata za cijelu Hrvatsku u istom razdoblju (66,1%). Sojevi jedinstvenog genotipa (45,8% u Međimurskoj županiji) vjerojatno predstavljaju endogenu reaktivaciju već postojeće infekcije pa su takvi sojevi češće izolirani u starijih osoba, dok se u mlađih osoba to ne može zaključiti

sa sigurnošću. Širenje sojeva i izvan granica županija potvrđuje i postojanje 20 klastera u kojima su, osim bolesnika iz Međimurske županije, sojevi bolesnika iz drugih županija. Tako najveći takav klaster ima ukupno 22 člana, od kojih su dva bolesnika iz Međimurske županije, a ostali iz različitih županija kontinentalne Hrvatske.

Učinkovitost protuepidemijskih mjera može se procjenjivati na osnovi udjela sojeva u klasterima; cilj je programa za borbu protiv tuberkuloze smanjivanje udjela tih sojeva. Naime, ako na određenom području prevladavaju sojevi jedinstvenog genotipa, to je znak da je udio nedavnog prijenosa bolesti, a time i sojeva u klasterima smanjen te su protuepidemijske mjere učinkovite.

Iz laboratorijskih podataka i rezultata genotipizacije vidljivo je da Međimurska županija ima povoljnu situaciju s obzirom na udio bolesnika s rezistentnom tuberkulozom. Ipak, incidencija tuberkuloze od 21,9/100.000 koja je iznad prosjeka za Hrvatsku, kao i udio sojeva u klasterima (54,2%) u usporedbi sa zemljama zapadne Europe još uvijek su relativno visoki. Učinkovitost svih karika u kontroli tuberkuloze tek će pridonijeti smanjenju njene pojavnosti te eradikaciji u budućnosti.

L I T E R A T U R A

1. WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO global report. 2010; [71 stranica]. Dostupno na URL adresi: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf. Datum pristupa informaciji 01. rujna 2010.
2. Savine E, Warren RM, van der Spuy GD i sur. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microb 2002; 40: 4561-6.
3. van Rie A, Warren R, Richardson M i sur. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. N Engl J Med 1999; 341: 1174-9.
4. Tazi L, Kreiswirth B, Carrière C, Tibayrenc M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and its relevance to the surveillance and control of TB: an e-debate. Infect Genet Evol 2002; 2: 153-8.
5. Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. Bull WHO 2002; 80: 477-82.
6. Supply P, Lesjean S, Mazars E, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol 2000; 36: 762-71.

7. Mazars E, Lesjean S, Banuls A-L i sur. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. PNAS 2001; 98: 1901-6.
8. Supply P, Allix C, Lesjean S i sur. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit – variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microb 2006; 44: 4498-510.
9. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann, S. Evaluation and user-strategy of MIRU-VN-TRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2008, 46:2692-9.
10. Long R. Drug-resistant tuberculosis. Can Med Assoc J 2000; 163: 425-8.
11. Obrovac M, Katalinić-Janković V, Grce M. Određivanje otpornosti *Mycobacterium tuberculosis* na izoniazid multipleks PCR metodom. Medicina 2007; 43: 47-54.
12. Herrera-León L, Molina T, Saíz P, Sáez-Nieto JA, Jiménez MS. New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 144-7.
13. Mc Nabb SJN, Kammerer JS, Hickey AC i sur. Added epidemiologic value to tuberculosis prevention and control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Am J Epidemiol 2004; 160: 589-97.
14. Sintchenko V, Gilbert GL. Utility of genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in the contact investigation: A decision analysis. Tuberculosis 2007; 87: 176-84.
15. van Deutekom H, Hoijing SP, de Haas PEW i sur. Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier? Am J Crit Care Med 2004; 169: 806-10.
16. Daley CL. Tuberculosis contact investigations. Please don't fail me now. Am J Respir Crit Care Med 2004; 169: 779-81.

S U M M A R Y

SIGNIFICANCE OF LABORATORY STATISTICS IN TUBERCULOSIS CONTROL IN MEĐIMURJE COUNTY

M. PAYERL-PAL, V. KATALINIĆ-JANKOVIĆ¹, M. OBROVAC¹, V. VRŠIĆ-KRIŠTOFIĆ,
B. POJE-JELENIĆ and M. ZADAVEC

*Institute of Public Health, Međimurje County, Čakovec and ¹Croatian National Institute
of Public Health, Zagreb, Croatia*

Microbiological diagnosis of tuberculosis is the axis of any national tuberculosis control program. Tuberculosis notification rate in Međimurje County has been equivalent to the national average, except in 2009 when it (23/100,000) surpassed the national rate of 19.3/100,000.

The aim of this study was to analyze laboratory results (age, sex, site of the disease, drug susceptibility test results, and genotyping results) in tuberculosis control in Međimurje County.

Material, Methods and Results: A prospective study of genotyping all newly isolated *Mycobacterium tuberculosis* strains is currently conducted at the Croatian National Institute of Public Health, Tuberculosis Diagnostic Department. The genotyping method used is determining variable number of tandem repeats of mycobacterial repetitive interspersed unit. Between 2007 and 2009, a total of 59 strains from patients coming from Međimurje County were genotyped, 27 (45.8%) of which had a unique genotype in the national database, while 32 (54.2%) were grouped in 22 clusters with 2 to 22 pertaining strains. Two of 22 clusters, one with two and one with five members each, were made up from strains isolated solely in Međimurje County. These strains are not only characteristic of the County, but the patients they originated from had most likely been exposed to the same route of transmission. The remaining 25 strains were grouped in 20 clusters. The patients they came from were from different parts of Croatia, while the number of Međimurje natives in these clusters varied between 1 and 3. A relatively high percentage of strains of unique genotype pointed to a relatively low degree of recent transmission. The results of molecular epidemiology analysis as part of monitoring the routes of tuberculosis transmission, showed the efficiency of counter epidemic measures by detection of unexpected routes of transmission and by identification of strains present in a given community, which more often than others cause disease.

Key words: tuberculosis, molecular epidemiology, Međimurje County