

Molekularna epidemiologija – što smo naučili u praćenju prijenosa tuberkuloze

Mihaela OBROVAC¹⁾, dr. sc., mag. medicinske biokemije
Ljiljana ŽMAK¹⁾, dr. sc., dr. med.,
specijalist medicinske mikrobiologije s
parazitologijom
Vera KATALINIĆ-JANKOVIĆ¹⁾, prim., dr. med.,
specijalist medicinske mikrobiologije
s parazitologijom

¹⁾Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

Ključne riječi

tuberkuloza
genotipizacija
MIRU-VNTR
molekularna epidemiologija

Key words

tuberculosis
genotyping
MIRU-VNTR
molecular epidemiology

Primljeno: 2013–04–04

Received: 2013–04–04

Prihvaćeno: 2013–06–30

Accepted: 2013–06–30

Uvod

Sedamdesetih godina 20. stoljeća tuberkuloza se smatrala svladanom bolešću, no ipak je i danas najčešća smrtonosna bakterijska izlječiva bolest [1]. To čini *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) jednim od najuspješnijih bakterijskih patogena u povijesti, a praćenje prijenosa bolesti posebnim izazovom. Tuberkuloza se najčešće prenosi s osobe koja boluje od plućne tuberkuloze na drugu osobu putem aerosola koji se stvara kad bolesna osoba kašlje, kiše, pjeva ili govori. Mogućnost da se izložena osoba zarazi ovisi najviše o intenzitetu, učestalosti i trajanju izloženosti bacilima tuberkuloze [2, 3]. Ipak, pokazalo se da su slučajni kontakti i sporadični slučajevi, usprkos tome što ih je teško dokazati, odgovorni za većinu mikroepidemija i čine važan način prijenosa tuberkuloze [4]. Nekad su se u svrhu otkrivanja putova prijenosa koris-

Pregledni rad

Molekularno-epidemiološke studije, zasnovane na genotipizaciji kliničkih izolata *M. tuberculosis*, daju novu dimenziju metodama deskriptivne epidemiologije i omogućavaju praćenje prijenosa infekcije na globalnoj, nacionalnoj ili lokalnoj razini. Genotipizacija svih kliničkih izolata izoliranih u novooboljelih bolesnika u Hrvatskoj provodi se od 2007. godine. Koristi se metoda MIRU-VNTR, a rezultat genotipizacije je 15-člani numerički kod koji se pohranjuje u nacionalnu bazu genotipova *M. tuberculosis*. U ovom radu prikazan je presjek mogućnosti primjene rezultata genotipizacije u praćenju prijenosa tuberkuloze kao što su dokaz postojanja mikroepidemije ili lažno pozitivnih kultura, otkrivanje prijenosa koji nije uočen metodama deskriptivne epidemiologije, prijenos tuberkuloze sa čovjeka na životinju i obrnuto te ostalo.

Molecular epidemiology – what have we learned in TB transmission follow-up

Review article

Molecular epidemiology studies, based on *M. tuberculosis* strains genotyping, add new dimension to descriptive epidemiology approach by enabling the follow-up of spread of tuberculosis on local, national and global level. In Croatia, all *M. tuberculosis* clinical strains isolated in newly diagnosed patients are genotyped since 2007. The MIRU-VNTR method is used, and the result is in the form of a 15-digit numerical code that is stored in the national database of *M. tuberculosis* genotypes. In this paper, various possibilities of using genotyping results in tuberculosis follow-up are presented, such as confirming the existence of an outbreak, revealing false positive cultures, transmission that was unnoticed by descriptive epidemiology approach, transmission from human to animal host and vice versa, etc.

tile fagotipizacija, profili rezistencije na antituberkulotske lijekove (ATL) i serologija, no te metode nisu bile dovoljno diskriminatorne [5]. Tek otkrićem različitih metoda genotipizacije, zasnovanih na određivanju značajki deoksiribonukleinske kiseline (DNK), počinje učinkovito praćenje prijenosa tuberkuloze na molekularnoj razini [6].

Molekularna epidemiologija tuberkuloze

Molekularna epidemiologija, spoj metoda molekularne biologije i epidemiologije, omogućava razumijevanje prijenosa te može omogućiti procjenu veze čimbenika rizika s prijenosom bolesti, otkrivanje i potvrdu mikroepidemija unutar institucija, otkrivanje sojeva od javnozdravstvenog značaja te razlikovanje između reaktivacije bolesti i ponovne infekcije [7]. Moguće je i pratiti

prijenos infekcije na globalnoj, nacionalnoj ili lokalnoj razini. Na lokalnoj razini, ukoliko epidemiološki podaci upućuju na postojanje mikroepidemije, genotipizacijom je moguće potvrditi da li je došlo do prijenosa ili se istovremeno pojavilo više odvojenih slučajeva bolesti.

S gledišta molekularne epidemiologije, klasteri (dva ili više sojeva identičnih ispitivanih značajki DNK, tj. genotipa) su definirani kao epidemiološki vjerojatno povezani slučajevi nedavnog prijenosa bolesti. Izolati jedinstvenog genotipa obično se smatraju slučajevima reaktivacije prethodno preboljele bolesti [8].

Metoda MIRU-VNTR

Od raznih molekularnih metoda koje se danas koriste za genotipizaciju članova *M. tuberculosis* kompleksa (MTBC), metoda MIRU-VNTR (od engl. *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units; Variable Number of Tandem Repeats*) danas preuzima ulogu metode prvog izbora. Zbog jednostavnosti izvođenja i reproducibilnosti izuzetno je prikladna za epidemiološko praćenje tuberkuloze [9, 10, 11]. Metoda MIRU-VNTR se zasniva na umnažanju tandemski ponovljenih sljedova nukleotida u genomu *M. tuberculosis*. Ukratko, ciljni dijelovi umnože se korištenjem specifičnih početnica, a dobiveni produkti razdvoje se elektroforezom na agaroznom gelu. Veličina produkata umnažanja odražava broj ciljnih kopija MIRU-VNTR koji varira među različitim sojevima. Od 2006. godine preporučena metoda za genotipizaciju sojeva *M. tuberculosis* je metoda MIRU-VNTR koja uključuje određivanje ukupno 24 lokusa, pri čemu diskriminatorski set čini 15 lokusa, a dodatni set još 9 [12]. 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*. Rezultati se mogu dodatno analizirati korištenjem mrežne baze podataka MIRU-VNTRplus (www.miru-vntrplus.org) [13, 14]. Ova je baza podataka razvijena kao metoda za klonalnu identifikaciju izolata MTBC. Referentne sojeve u bazi čini kolekcija od ukupno 186 dobro okarakteriziranih sojeva, predstavnika šest primarnih obitelji MTBC. Svaka od tih obitelji povezana je s određenim geografskim područjem što odražava naziv obitelji; definirane su 4 obitelji *M. tuberculosis*, nazvane *Indo-Oceanic*, *East Asian*, *East African-Indian* i *Euro-American*, te dvije obitelji *M. africanum*, *West African I* i *West African II* [15]. Unošenjem rezultata genotipizacije u bazu podataka MIRU-VNTRplus moguće ih je usporediti s referentnim sojevima te u većini slučajeva odrediti pripadnost genotipiziranih sojeva određenoj obitelji tuberkuloze.

Genotipizacija sojeva *M. tuberculosis* u Hrvatskoj

Na Odjelu za dijagnostiku tuberkuloze Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu od siječnja 2007. go-

dine provodi se prospektivna studija genotipizacije metodom MIRU-VNTR. Genotipiziraju se sojevi MTBC izolirani u svih novooboljelih bakteriološki potvrđenih bolesnika, tako da jedan izolirani soj odgovara jednom bolesniku. Ponovno se genotipiziraju i sojevi izolirani u bolesnika od čijeg je prethodnog kulturom pozitivnog uzorka prošlo više od dvije godine. Koristi se diskriminatorski set od 15 MIRU lokusa, a ukoliko su sojevi multirezistentni (rezistencija najmanje na izoniazid i rifampicin), koristi se potpuna karakterizacija setom od 24 lokusa [12]. Osim izolirane DNK, pohranjuju se i sojevi analiziranih *M. tuberculosis*, čineći tako bio-banku sojeva koja omogućava da se rezultati genotipiziranja mogu po potrebi ponoviti ili nadopuniti. Od siječnja 2007. do siječnja 2014. godine genotipizirano je oko 4400 sojeva *M. tuberculosis*. Dobiveni rezultati pohranjuju se u obliku 15-članog numeričkog koda u osobno računalo, analiziraju korištenjem mrežne baze podataka MIRU-VNTRplus te čine nacionalnu bazu genotipova *M. tuberculosis*.

Primjeri moguće primjene rezultata genotipizacije

1. Mikroepidemije i tuberkuloza u obitelji

Rezultati različitih molekularno-epidemioloških studija pokazali su da se primjenom isključivo metoda deskriptivne epidemiologije često može previdjeti povezanost bolesnika inficiranih sojevima *M. tuberculosis* identičnog genotipa [16, 17, 18]. Primjeri iz hrvatske nacionalne baze genotipova u skladu su s podacima iz literature; postoji više primjera postojanja identičnog genotipa na određenom geografski ograničenom području za koje su do sada nisu otkriveni putovi prijenosa bolesti metodama deskriptivne epidemiologije. Tako je primjerice u dvije lokalne zajednice otkriveno 15 odnosno 17 oboljelih osoba mlađe životne dobi, s izolatima identičnog karakterističnog genotipa unutar svake zajednice, za koje do sada nije pronađena epidemiološka poveznica (podaci HZJZ). Primjenom genotipizacije identificiran je i klinički izolat *M. tuberculosis* koji je uzrokovao tuberkulozu u više osoba koje su u različito vrijeme boravile u više različitih psihijatrijskih bolnica i ustanova za skrb. Može se pretpostaviti da je neki od bolesnika premještanjem u drugu ustanovu prenio i izolat koji se potom proširio u toj ustanovi. Također, utvrđena je mikroepidemija unutar ustanove za skrb o odraslim osobama lišenim poslovne sposobnosti. Zbog dugotrajnog međusobnog kontakta štićenika, postoji velika mogućnost prijenosa uzročnika pa je ovakav rezultat očekivan. Ipak, postoje i drugačiji slučajevi, kao primjerice radna zajednica u kojoj je u kratkom vremenu 5 osoba oboljelo od tuberkuloze. Od ukupno četiri bakteriološki potvrđena bolesnika iz te radne zajednice, samo su dva bolesnika oboljela od uzročnika istog genotipa, dok su u preostalo dvoje izolirani sojevi jedinstvenog genotipa. Ti rezultati ukazuju da

su postojala najmanje tri izvora prijenosa bolesti, a ne samo jedan. U dva slučaja tuberkuloze u obitelji dokazano je da su bolest u članova iste obitelji uzrokovali različiti sojevi *M. tbc*. U jednom se slučaju radilo o braći, a u drugom o ocu i sinu. Ipak, mnogo su češće zabilježeni slučajevi tuberkuloze u obitelji uzrokovani identičnim sojevima *M. tbc* (podaci HZJZ).

2. Udio klasteriranja

Udio klasteriranja ukazuje na razinu nedavnog prijenosa bolesti te će biti to viši što je učestaliji prijenos bolesti od reaktivacije prethodno preboljele bolesti. U analizi rezultata genotipizacije sojeva *M. tbc* izoliranih u Hrvatskoj od 2009. do 2011. godine, utvrđeno je da je udio klasteriranja iznosio 47,8 % za ukupno 1587 testiranih izolata. Od tih izolata, ukupno 996 (63 %) izolata bilo je uključeno u 236 klastera veličine od 2 (114 klastera) do 45 (1 klaster) bolesnika [19]. Takav visoki udio klasteriranja ukazuje na još uvijek visoku razinu prijenosa tuberkuloze u Hrvatskoj. Ipak, pri interpretaciji tih rezultata potrebno je uključiti i metode deskriptivne epidemiologije. Naime, otkriveni su klasteri, kao što je i najveći klaster iz perioda od 2009. do 2011. godine s 45 bolesnika, u kojima su bolesnici geografski razdvojeni jer potječu iz različitih županija. Takvi klasteri bez očitih epidemioloških veza mogu nastati kao posljedica naročite zastupljenosti nekih sojeva u populaciji. Moguć je nastanak "pseudoklastera" u slučajevima reaktivacije bolesti u starijih osoba kao posljedice infekcije sojem koji je vjerojatno bio čest u njihovoj mladosti, a ne prijenosa u sadašnjem vremenu [20]. Ne može se isključiti ni mogućnost laboratorijske kontaminacije u slučaju da su oba izolata obrađivana u isto vrijeme.

3. Lažno pozitivne kulture

Genotipizacijom sojeva moguće je utvrditi postojanje kontaminacije koja može nastati ili pri uzimanju uzorka ili pri laboratorijskoj obradi. Pri uzimanju uzorka korištenjem bronhoskopa posebno je važna kvalitetna dezinfekcija bronhoskopa; uz kontaminaciju uzoraka drugih pacijenata, moguć je i prijenos infekcije na druge pacijente [21]. Procjenjuje se da je udio lažno pozitivnih kultura *M. tbc* kao posljedica laboratorijske kontaminacije oko 3 % [17, 22]. Na kontaminaciju se mora posumnjati ukoliko se radi samo o jednoj pozitivnoj kulturi u pacijenta koji je dao više uzoraka, potom ukoliko se radi o pozitivnoj kulturi pacijenta koji je bio mikroskopski negativan, a istovremeno je obrađivan mikroskopski pozitivan uzorak drugog pacijenta te ukoliko klinički simptomi ne odgovaraju slici tuberkuloze [22]. Budući da je metoda MIRU-VNTR brza i jednostavna za izvođenje, naročito je pogodna za praćenje laboratorijskih kontaminacija i otkrivanje lažno pozitivnih kultura [23]. Pravovremenim otkrivanjem kontaminacije sprječava se bespotrebno izlaganje pacijenta terapi-

ji ATL, nepotrebni epidemiološki izvodi te profilaksa [22, 24]. Do danas su dokazane lažno pozitivne kulture koje su bile posljedica laboratorijske kontaminacije (mikroskopski jako pozitivan uzorak kontaminirao je negativan uzorak), kao i one koje su bile posljedica loše dezinfekcije bronhoskopa (podaci HZJZ).

4. Recidiv, ponovna infekcija, miješana infekcija

Metode genotipizacije omogućile su razlikovanje među bolesnicima kod kojih je došlo do recidiva bolesti od onih koji su zaraženi drugim sojem. Dokazano je da prethodno izlaganje tuberkulozi ne štiti od naknadne egzogene reinfekcije i bolesti [25, 26]. Postojanje miješane infekcije korištenjem metode MIRU-VNTR moguće je potvrditi ukoliko za dva ili više lokusa postoji više numeričkih vrijednosti. Tako je u bolesnika koji je bolovao 2007. godine utvrđen soj jednog genotipa, a 2011. potpuno drugačijeg. Treći je izolat istog bolesnika izoliran kasnije 2011. godine i ponovno tipiziran da bi se isključila mogućnost lažno pozitivne kulture drugog izolata. U trećem izolatu utvrđena je miješana infekcija s oba prethodno izolirana soja. Može se zaključiti da je u ovog bolesnika gotovo istovremeno došlo i do recidiva bolesti i do ponovne infekcije novim sojem. Miješana infekcija dokazana je i slučaju bolesnika čiji je klinički izolat poslan na genotipizaciju iz dvije različite ustanove. Obradom oba izolata dobiven je identičan rezultat, identificirana su dva genotipa. Kako je mogućnost da je u obje ustanove došlo do kontaminacije pozitivne kulture drugim sojem izuzetno mala, može se utvrditi da je bolesnik istovremeno zaražen dvama sojevima *M. tbc*. Istovremeno postojanje različitih sojeva otvara mogućnost veće sklonosti razvoju rezistencije kao i previđanju već postojeće rezistencije na ATL.

5. Prijenos među različitim vrstama

Osim pretežno humanog patogena *M. tbc*, tuberkulozu u ljudi mogu uzrokovati i pripadnici MTBC koji su prvenstveno patogeni životinja, kao što je *M. caprae*. *M. caprae* ima specifičan genotip pa ga je metodom MIRU-VNTR moguće i identificirati i genotipizirati. Genotipizacijom sojeva *M. caprae* izoliranih u djeteta i goveda dokazan je prijenos uzročnika sa životinje na čovjeka. Iz uzorka punkтата cervikalnog limfnog čvora djeteta izoliran je *M. caprae*. Kako se obitelj djeteta bavila mljekarstvom, provedeno je tuberkulinsko testiranje goveda na farmi, a pozitivna i sumnjiva goveda su žrtvovana i ispitana na prisutnost uzročnika. Izolirani *M. caprae* je bio identičnog genotipa kao i onaj izoliran u djeteta [27]. Također, dokazan je i prijenos *M. tbc* s čovjeka na životinju. Iz uzorka bronhijalnih limfnih čvorova goveda koje je žrtvovano nakon pozitivnog nalaza tuberkulinizacije izoliran je *M. tbc*. Vlasnik goveda je ranije iste godine umro od tuberkuloze te je rezultat genotipizacije tog soja već postojao u bazi genotipova. Nakon genotipizacije soja izoliranog u

životinje utvrđeno je da su sojevi identični te time potvrđen prijenos [28].

6. Filogenetska analiza

Uz praćenje prijenosa tuberkuloze na razini soja, MIRU-VNTR su i filogenetski informativni pa se mogu koristiti da bi se predvidjelo grupiranje pojedinih sojeva u određene obitelji *M. tbc*, karakteristične za određena geografska područja i populaciju tog područja [12, 29, 30]. Korištenjem baze podataka MIRU-VNTR $plus$ je po prvi put u Hrvatskoj dokazana i prisutnost sojeva iz obitelji *Beijing*, obitelji koja je rasprostranjena u istočnoj Aziji, Ruskoj federaciji i Baltičkim republikama [31]. Tu obitelj karakterizira visoka razina prenosivosti, sklonost stvaranju rezistencije na ATL i teži simptomi bolesti. Uvidom u epidemiološke podatke bolesnika zaraženog sojem *Beijing*, utvrđeno je da je bolesnik neko vrijeme boravio u Rusiji tako da se vjerojatno tamo zarazio tuberkulozom (podaci HZJZ). Nakon toga su sojevi iz iste obitelji izolirani i u osoba kineske nacionalnosti, za koje se isto može pretpostaviti da su se zarazile prije dolaska u Hrvatsku. Na isti je način dokazana prisutnost soja iz obitelji *East-African Indian*, obitelji rasprostranjene u istočnoj Africi i Indiji, u bolesnika koji je često boravio u Indiji [19]. Usporedbom rezultata genotipizacije soja izoliranog u emigranta iz Toga s referentnim sojevima iz baze podataka MIRU-VNTR $plus$, potvrđena je i izolacija *M. africanum* koji pripada obitelji *West african II* [19].

Zaključak

Postojanje još uvijek neotkrivenih putova prijenosa tuberkuloze unutar različitih zajednica ukazuju na nužnost integracije deskriptivne i molekularne epidemiologije. Samo se na taj način prijenos sojeva *M. tbc* može učinkovito pratiti te spriječiti njihovo širenje. Usporedno s povećanim migracijama stanovništva, uz već zabilježene, u Hrvatskoj se može očekivati daljnja pojava sojeva *M. tbc* koji do sada nisu bili prisutni u populaciji.

Literatura

- [1] Loddenkemper R, Hauer B. Drug-Resistant Tuberculosis. A Worldwide Epidemic Poses a New Challenge. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 10–9.
- [2] Styblo K. Epidemiology of tuberculosis. Selected papers 24. The Hague: Royal Netherlands Tuberculosis Association, 1991.
- [3] Enarson DA, Chretien J. Epidemiology of respiratory infectious diseases. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5: 128–35.
- [4] Golub JE, Cronin WA, Obasanjo OO, i sur. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* through casual contact with an infectious case. *Arch Intern Med*. 2001; 161: 2254–8.
- [5] Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 781–91.
- [6] 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.
- [7] Tazi L, Kreiswirth B, Carriere 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.
- [8] Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. *Bull World Health Org* 2002; 80: 477–82.
- [9] Supply P, Lesjean S, Mazars E, Vincent V, Gicquel B, Loch C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36: 762–77.
- [10] 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.
- [11] van Deutekom H, Supply P, de Haas PEW, i sur. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4473–9.
- [12] 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.
- [13] Allix-Béguet C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTR $plus$, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2692–9.
- [14] Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen, D. MIRU-VNTR $plus$: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 2010; 38 (suppl W): 326–31.
- [15] Gagneux S, DeRiemer K, Van T i sur. Variable host – pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2869–73.
- [16] van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249: 1–26.
- [17] Barnes PF, Cave D. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 1149–56.
- [18] Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: Current Insights. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 658–85.
- [19] Žmak Lj, Obrovac M, Katalinić-Janković V. First insights into the molecular epidemiology of tuberculosis in Croatia during a three-year period, 2009 to 2011. *Scand J Infect Dis* 2014; 46: 123–9.
- [20] Prodinger WM. Molecular epidemiology of tuberculosis: toy or tool? A review of the literature and examples from Central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 2007; 119: 80–9.
- [21] Agerton T, Valway S, Gore B, i sur. Transmission of a highly drug-resistant strain (strain W1) of *Mycobacterium tuberculosis*.

- Community outbreak and nosocomial transmission via a contaminated bronchoscope. *JAMA* 1997; 278: 1073–7.
- [22] Burman WJ, Reves RR. Review of False-Positive Cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and Recommendations for Avoiding Unnecessary Treatment. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1390–5.
- [23] Martín A, Herranz M, Lirola MM i sur. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. *BMC Microbiol* 2008; 8:30. doi: 10.1186/1471-2180-8-30.
- [24] Clark CM, Driver CR, Munsiff SS, i sur. Universal genotyping in tuberculosis control program, New York City, 2001–2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 719–24.
- [25] Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, i sur. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 1137–44.
- [26] Comas I, Gagneux S. The Past and Future of Tuberculosis Research. *PLoS Pathog* 2009; 5(10): e1000600. doi:10.1371/journal.ppat.1000600.
- [27] Cvetnić Ž, Katalinić-Janković V, Šošarić B, i sur. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 652–8.
- [28] Špičić S, Pate M, Duvnjak S, i sur. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* transmission between cattle and man – a case report. *Vet arhiv* 2012; 82: 303–10.
- [29] Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, i sur. Origin, Spread and Demography of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS Pathog* 2008; 4(9): e1000160. doi:10.1371/journal.ppat.1000160.
- [30] Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4871–6.
- [31] Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L i sur. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006; 6: 23 (<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-6-23.pdf>)