

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Urška BIDOVEC-STOJKOVIČ

**MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJ IZ  
SKLOPA *Mycobacterium tuberculosis***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Urška BIDOVEC-STOJKOVIČ

**MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJ IZ  
SKLOPA *Mycobacterium tuberculosis***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MOLECULAR TYPING OF *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 14.11.2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za **doktorski Univerzitetni podiplomski študij Biomedicine ter opravljanje doktorata znanosti s področja mikrobiologije**. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik. Epidemiološki podatki so bili pridobljeni na Registru za tuberkulozo Klinike Golnik.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

UL, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mario POLJAK, dr. med.

UL, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK, univ. dipl. biol.

UL, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: znan. svet. dr. Matjaž OCEPEK, dr. vet. med.

UL, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

Datum zagovora: 11.2.2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka:

Urška Bidovec-Stojkovič, univ. dipl. biol.

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd  
DK UDK 579.61:579.873.2:616-036.22:577.2.083(043)=163.6  
KG tuberkuloza / *Mycobacterium tuberculosis* /molekularna tipizacija / IS6110RFLP / spoligotipizacija / MIRU-VNTR 24 lokusov  
AV BIDOVEC-STOJKOVIČ, Urška, univ. dipl. biol.  
SA SEME, Katja (mentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, področje mikrobiologije  
LI 2016  
IN MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJ IZ SKLOPA *Mycobacterium tuberculosis*  
TD Doktorska disertacija  
OP XVII, 140 str., 19 pregl., 37 sl., 2 pril., 165 vir.  
IJ SI  
JI sl/en  
AI Učinkovit nadzor nad širjenjem nalezljive bolezni, kot je tuberkuloza, zagotavljajo le ustrezne metode genotipizacije, ki odkrivajo prenos okužbe z bacili tuberkuloze. Metoda RFLP IS6110 (RFLP), kot dolgoletni zlati standard, metoda MIRU-VNTR in metoda spoligotipizacije so trenutno najbolj uveljavljene in uporabljane metode na tem področju. Slovenija je bila ena izmed redkih držav na svetu, kjer se je metoda RFLP od leta 2000 uporabljala za genotipizacijo vseh izolatov *M. tuberculosis* na nacionalni ravni. S to metodo so bili v Sloveniji prepoznani in opisani najpomembnejši dejavniki tveganja za obolenje s tuberkulozo. Da bi v Sloveniji lahko metodo RFLP zamenjali s hitrejšo in podobno učinkovito metodo, smo naredili obširno retrospektivno analizo rezultatov treh različnih tipizacijskih metod (RFLP, MIRU-VNTR in spoligotipizacija), na vseh izolatih (n=576) v obdobju treh let (2007-2009). Triletna primerjalna analiza rezultatov metod RFLP, MIRU-VNTR/24 in spoligotipizacije je pokazala, da lahko metoda MIRU-VNTR/24 ustrezno nadomesti metodo RFLP (v odsotnosti metode spoligotipizacije) in postane metoda izbora tipizacije slovenskih izolatov bacilov tuberkuloze. Obe tipizacijski metodi epidemiološko ustrezno povežejo bolnike s tuberkulozo. Metoda MIRU-VNTR/24 omogoča tipizacijo bacilov tuberkuloze iz prvih bakterijskih kultur in s tem zelo pomembno skrajša čas od odkritja novega bolnika s tuberkulozo do končnega rezultata genotipizacije. Čas je krajši za vsaj tri tedne in rezultat genotipizacije je dostopen že v času, ko je bolnik še v bolnišnici. Metoda spoligotipizacije se je izkazala kot dobra dopolnilna metoda v primeru nejasnosti tipizacijskih rezultatov metode MIRU VNTR oziroma, ko je potrebno določiti kateri svetovni genetski liniji pripada genotip in bi bila genetska linija pomembna z vidika invazivnosti in odpornosti na zdravila. Kot prvi v svetovnem merilu, smo s prospektivno raziskavo jasno dokazali, da je možna neposredna tipizacija bacilov tuberkuloze iz kliničnih vzorcev (n=79). Uspešnost tipizacije z metodo MIRU-VNTR/24 neposredno iz kliničnih vzorcev korelira s stopnjo mikroskopske pozitivnosti vzorca. Hkrati smo tudi prvi v svetovnem merilu dokazali, da je možna tipizacija bacilov tuberkuloze iz svežih kliničnih vzorcev še več tednov po začetku zdravljenja.



### KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd  
DC UDC 579.61:579.873.2:616-036.22:577.2.083(043)=163.6  
CX tuberculosis / *Mycobacterium tuberculosis* / molecular typing / IS6110RFLP / spoligotyping / 24-locus MIRU-VNTR  
AU BIDOVEC-STOJKOVIČ, Urška  
AA SEME, Katja (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field Microbiology  
PY 2016  
TI MOLECULAR TYPING OF *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX  
DT Doctoral dissertation  
NO XVII, 140 p., 19 tab., 37 fig., 2 ann., 165 ref.  
LA SI  
AL sl/en  
AB The worldwide threat of tuberculosis to human health means there is an urgent need to develop new approaches to global epidemiological surveillance. The molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* has greatly improved knowledge of tuberculosis epidemiology and enabled molecular-guided control of the disease. Since 1993, the gold-standard technique for *M. tuberculosis* genotyping has been IS6110 RFLP (RFLP) typing. RFLP has been proven useful for conducting population-based studies of tuberculosis transmission. Slovenia is one of the few countries of the world where RFLP is applied as the gold standard for genotyping *M. tuberculosis* at a nationwide level, and this has been true since 2000. Based on this method, typical risk factors and routes of *M. tuberculosis* transmission were identified. In order to switch from RFLP to 24-locus variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Slovenia, a detailed evaluation on discriminatory power and agreement with findings in a cluster investigation was performed on 576 tuberculosis isolates during the period of 2007 to 2009. The level of discrimination of the two typing methods did not differ substantially. We conclude that MIRU-VNTR typing has a discriminatory power equal to RFLP typing. This study makes MIRU-VNTR typing a suitable method for tuberculosis surveillance systems. In addition our prospective study confirmed that *M. tuberculosis* genotyping using the MIRU-VNTR method can be performed directly on fresh clinical samples (n=79) using standard procedures originally developed for bacterial culture. Direct typing is more successful using early samples with high smear grades, although the nature and quality of the sample may influence the typeability. MIRU-VNTR typing is suitable to become method of choice for typing *M. tuberculosis* complex isolates in Slovenia.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b> .....	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b> .....	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG</b> .....	<b>XV</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	4
1.2 HIPOTEZE.....	5
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>6</b>
2.1 ZGODOVINA GENOTIPIZACIJE .....	6
2.2 KLASIFIKACIJA MIKOBAKTERIJ .....	9
2.3 PATOGENOST MIKOBAKTERIJ .....	10
2.4 TUBERKULOZA PRI ČLOVEKU .....	11
2.5 EPIDEMIOLOGIJA TUBERKULOZE .....	13
2.6 METODE MOLEKULARNE GENOTIPIZACIJE.....	17
<b>2.6.1 Razvoj genetskih linij iz sklopa M. tuberculosis</b> .....	<b>17</b>
<b>2.6.2 Razvoj metod molekularne genotipizacije</b> .....	<b>21</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>26</b>
3.1 MATERIAL .....	26
<b>3.1.1 Tipizacija iz bakterijskih kultur/bakterijskih izolatov</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.2 Tipizacija iz kliničnih vzorcev</b> .....	<b>27</b>
3.2 METODE .....	29
<b>3.2.1 Izolacija genomske DNK</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.2 Metoda RFLP</b> .....	<b>31</b>
3.2.2.1 Določanje koncentracije izolirane DNK.....	31
3.2.2.2 Razgradnja DNK .....	32
3.2.2.3 Ocena koncentracije DNK po razgradnji.....	33
3.2.2.4 Ločevanje fragmentov z elektroforezo .....	33
3.2.2.5 Prenos fragmentov DNK iz agaroznega gela na membrano (»Southern blot«).....	34
3.2.2.6 Priprava sonde DNK za hibridizacijo .....	35
3.2.2.7 Hibridizacija .....	37
3.2.2.8 Spiranje membrane po hibridizaciji.....	37
3.2.2.9 Detekcija.....	37

3.2.2.10 Računalniška obdelava podatkov .....	39
<b>3.2.3 Metoda spoligotipizacije .....</b>	<b>39</b>
3.2.3.1 Pomnoževanje DNK .....	40
3.2.3.2 Hibridizacija .....	41
3.2.3.3 Detekcija.....	43
3.2.3.4 Regeneracija membrane .....	44
3.2.3.5 Računalniška obdelava podatkov .....	45
<b>3.2.4 Metoda MIRU-VNTR/24 .....</b>	<b>45</b>
3.2.4.1 Pomnoževanje DNK .....	45
3.2.4.2 Fragmentna analiza pomnoženih segmentov DNK .....	48
3.2.4.3 Računalniška obdelava podatkov .....	52
<b>3.2.5 Proces obdelave in ekstrakcije DNK in ekstrakcije DNK iz kliničnih vzorcev .....</b>	<b>52</b>
3.3 RAČUNALNIŠKA ANALIZA PODATKOV .....	54
3.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV .....	55
3.5 EPIDEMIOLOŠKI PODATKI.....	57
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>58</b>
4.1 ANALIZA GENOTIPOV DOBLJENIH Z METODO RFLP.....	58
4.2 ANALIZA GENOTIPOV DOBLJENIH Z METODO SPOLIGOTIPIZACIJE .....	60
4.3 ANALIZA GENOTIPOV DOBLJENIH Z METODO MIRU-VNTR/24.....	65
4.4 PRIMERJAVA TREH RAZLIČNIH METOD TIPIZACIJE BACILOV IZ SKLOPA <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	68
4.5 NEPOSREDNA GENOTIPIZACIJA IZ KLINIČNIH VZORCEV .....	95
<b>4.5.1 Prvi vzorci .....</b>	<b>95</b>
<b>4.5.2 Ostali vzorci .....</b>	<b>96</b>
<b>4.5.3 Vsi vzorci .....</b>	<b>98</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>104</b>
5.1 VREDNOTENJE METOD MOLEKULARNE TIPIZACIJE BAKTERIJ IZ SKLOPA <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	104
5.2 MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJ IZ SKLOPA <i>M. TUBERCULOSIS</i> IZ KLINIČNIH VZORCEV .....	112
5.3 SKLEPI .....	116
<b>6 POVZETEK (SUMMARY).....</b>	<b>117</b>
6.1 SUMMARY .....	120
<b>7 VIRI.....</b>	<b>123</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Incidenca tuberkuloze v Sloveniji od leta 1996 do leta 2013 (Register za tuberkulozo, 2014a).....	16
Preglednica 2: Seznam vzorcev za tipizacijo z metodo MIRU-VNTR/24 iz kliničnih vzorcev, mikroskopska pozitivnost vzorcev in uspešnost tipizacije.....	28
Preglednica 3: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov INS 1 in INS 2, ki smo jih uporabili za tipizacijo z metodo RFLP.....	36
Preglednica 4: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov DRa in DRb, ki smo jih uporabili za tipizacijo z metodo spoligotipizacije.....	40
Preglednica 5: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov pri metodi MIRU-VNTR/24.....	47
Preglednica 6: Primer rezultata metode MIRU-VNTR (tabela excel).....	49
Preglednica 7: Metoda MIRU-VNTR/24. Oligonukleotidni začetniki, velikost namnoženega PCR pridelka v povezavi s številom ponovitev oligonukleotidnih zaporedij.....	51
Preglednica 8: Ocena mikroskopske pozitivnosti vzorcev. Barvanje po auraminu.....	52
Preglednica 9: Uvrščanje slovenskih izolatov v svetovno bazo podatkov SpolDB4. Slovenski izolati (N=576) so bili uvrščeni v 13 različnih svetovnih linij. Največ slovenskih izolatov pripada liniji Haarlem, sledi linija T in S.....	62
Preglednica 10: 75 genetskih družin dobljenih z metodo MIRU-VNTR. Oznaka genetske družine je sestavljena iz kode države (NSI), metode s katero je določena genetska družina (MV, MIRU-VNTR) in zaporedne številke genetske družine.....	66
Preglednica 11: Čas do rezultata posamezne tipizacijske metode (RFLP, MIRU-VNTR in spoligotipizacija).....	69
Preglednica 12: Primerjava treh tipizacijskih metod na 576 slovenskih izolatih; RFLP, spoligotipizacija in MIRU-VNTR/24.....	70
Preglednica 13: Razdelitev genetskih družin določenih z metodo MIRU-VNTR/24. V prvem stolpcu so navedene vse genetske družine določene z metodo MIRU-VNTR/24 s pripadajočimi oznakami in številom izolatov v posamezni družini. V drugih dveh stolpcih	

so ločene epidemiološko povezane od epidemiološko nepovezanih genetskih družin s pripadajočimi oznakami in številom izolatov v posamezni družini.....	74
Preglednica 14: Natančnejša analiza epidemiološko povezanih genetskih družin (obarvano oranžno) in ujemanje treh tipizacijskih metod (MIRU-VNTR/24, spoligotipizacija, RFLP).....	75
Preglednica 15: Podrobnejša statistična analiza epidemiološko povezanih genetskih družin.....	79
Preglednica 16: Rezultati tipizacije iz kliničnih vzorcev (n=26) z metodo MIRU-VNTR/24 povezanih z mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev.....	95
Preglednica 17: Rezultati tipizacije iz kliničnih vzorcev vzeti med nadaljnim zdravljenjem bolnikov s tuberkulozo (n=53) tipiziranih z metodo MIRU-VNTR/24 v povezavi z njihovo mikroskopsko pozitivnostjo.....	97
Preglednica 18: Tipizacija MIRU-VNTR/24 79 kliničnih vzorcev odvzetih pri 26 bolnikih s tuberkulozo v povezavi s časom zdravljenja bolnikov. Manjkajoči aleli so označeni z <i>nr</i> (ni rezultata).....	100
Nadaljevanje preglednice 18: Tipizacija MIRU-VNTR/24 79 kliničnih vzorcev odvzetih pri 26 bolnikih s tuberkulozo v povezavi s časom zdravljenja bolnikov. Manjkajoči aleli so označeni z <i>nr</i> (ni rezultata).....	101
Preglednica 19: Raznovrstnost 24-ih MIRU-VNTR alelov slovenskih izolatov iz sklopa <i>M. tuberculosis</i> (n=919). Analiza je bila narejena na osnovi retrospektivne analize in deležu manjkajočih alelov na posameznem lokusu v naši prospektivni analizi iz kliničnih vzorcev (n=79).....	103

## KAZALO SLIK

Slika 1: Razvoj in oblike tuberkuloze pri človeku (Košnik in sod., 2011).....	12
Slika 2: Incidenca tuberkuloze v svetu v letu 2012 (ECDC, 2014).....	13
Slika 3: Incidenca tuberkuloze v Evropi v letu 2012 (ECDC, 2014).....	13
Slika 4: Hipoteza evolucije bacilov <i>M. tuberculosis</i> . <i>M. prototuberculosis</i> naj bi bil prednik današnjih predstavnikov iz sklopa <i>M. tuberculosis</i> in naj bi se pojavil pred 40 000 leti v Mezopotamiji. Pred 10 000 leti naj bi se iz izvornega <i>M. prototuberculosis</i> razvili dve večji genetski liniji EAI in LAM. Pred 5 – 8 000 leti so se razvile lokalne oblike genetskih linij v povezanosti z migracijo; Afrika, Azija in Evropa. (Wirth in sod., 2008).....	19
Slika 5: Evolucijski razvoj predstavnikov sklopa <i>M. tuberculosis</i> . (A) Genetska povezanost bacilov tuberkuloze na osnovi koeficienta sorodnosti po Nei-u. (B) Dendrogram sorodnosti predstavnikov iz sklopa <i>M. tuberculosis</i> s predpostavko, da vsi izhajajo iz skupnega prednika <i>M. prototuberculosis</i> . Dolžina veje dendrograma sovпада s sorodnostjo med posameznimi predstavniki sklopa. (C) Populacijska zgradba in razvoj svetovnih genetskih linij (Wirth in sod., 2008).....	20
Slika 6: Hipotetičen shematski prikaz kromosoma mikobakterije iz sklopa <i>M. tuberculosis</i> . (1) IS6110-RFLP, (2) spoligotipizacija, (3) MIRU-VNTR, (4, 5) dve tipizacijski metodi na osnovi PCR (dvojni ponovljivi element-DRE-PCR in amplitipizacija), (6) vgnezdna inverzna PCR (HIP) in (7) z ligacijo posredovan PCR (LM-PCR) (Jagielski in sod., 2014).....	21
Slika 7: Označevanje membrane za Southern Blot pri metodi RFLP.....	34
Slika 8: Primer rezultata metode RFLP. Na mestu 2, 11 in 19 je RFLP vzorec DNK izolirane iz primerjalnih (referenčnih) izolatov ( <i>M. tuberculosis</i> MT 14323). Na mestu 3-10, 12-18 in 20 je RFLP vzorec dobljen iz kliničnih izolatov (Laboratorij za mikobakterije Golnik).....	38
Slika 9: Princip metode spoligotipizacije. H37Rv in BCG sta izolata, ki služita kot pozitivna kontrola ( <i>M. tuberculosis</i> izolat H37Rv in <i>M. bovis</i> BCG). DR je specifičen del kromosomalnega lokusa imenovan »Direct Repeat region«.....	41
Slika 10: Minibloter in nanašanje vzorcev za metodo spoligotipizacije.....	41

Slika 11: Primer metode spoligotipizacije (A). Vrstica 8 predstavlja pozitivno kontrolo <i>M. tuberculosis</i> H37Ra, vrstica 9 je pozitivna kontrola <i>M. bovis</i> BCG, vrstice 7, 10, 16, 30, 39 predstavljajo negativno kontrolo, ostale vrstice so različni slovenski spoligotipi. Primer najpomembnejših svetovnih spoligolinij je predstavljen na sliki B.....	44
Slika 12: Metoda MIRU-VNTR/24. Emisijski spektri štirih barvil in standarda LIZ 1200.....	49
Slika 13: Metoda MIRU-VNTR/24. Fragmentna analiza v programu Foundation Data collection verzija 3,0 (A) in analiza podatkov v programu GeneMapper verzija 4,0 (B)...	50
Slika 14: Geografska razporeditev bolnikov s tuberkulozo v Sloveniji v letih 2006-2009 (576 bolnikov), glede na njihovo prebivališče v času zdravljenja. Z rdečo piko so označeni posamezni primeri, z zeleno skupina bolnikov velikosti 2-10, z rumeno piko pa so označeni kraji, kjer je gostota primerov s tuberkulozo > 10 bolnikov (Register za tuberkulozo, 2014b).....	54
Slika 15: Metoda RFLP. Dendrogram sorodnosti genetskih družin (n=78) 576 izolatov iz sklopa <i>M. tuberculosis</i> dobljenih z metodo RFLP. Za analizo podatkov smo uporabili program Bionumerics, dendrogram UPGMA in koeficient podobnosti Dice z 1,0 % intervalom zaupanja.....	59
Slika 16: Metoda spoligotipizacije. Dendrogram sorodnosti genetskih družin (n=50) 576 izolatov iz sklopa <i>M. tuberculosis</i> dobljenih z metodo spoligotipizacije. Za analizo podatkov smo uporabili program Bionumerics, dendrogram UPGMA in kategorični koeficient podobnosti.....	61
Slika 17: Spoligotipi v Sloveniji. Baza podatkov SpolDB4 je slovenske izolate (N=576) uvrstila v 13 različnih svetovnih linij. Največ slovenskih izolatov pripada liniji Haarlem, sledi linija T in S.....	63
Slika 18: Spoligolinija Haarlem v Sloveniji. Spoligolinija Haarlem je med slovenskimi izolati (N=576) najbolj zastopana in ima 10 različnih podlinij.....	63
Slika 19: Spoligolinija T v Sloveniji. Spoligolinija T je med slovenskimi izolati (N=576) druga najbolj zastopana in ima 5 različnih podlinij.....	64
Slika 20: Spoligolinija LAM v Sloveniji. Spoligolinija LAM je med slovenskimi izolati (N=576) ima 5 različnih podlinij.....	64

- Slika 21: Dendrogram sorodnosti genetskih družin (n=75) 576 izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* dobljenih z metodo MIRU-VNTR/24. Za analizo podatkov smo uporabili program Bionumerics, dendrogram UPGMA in kategorični koeficient podobnosti.....67
- Slika 22: Minimalno vpeto drevo 576 slovenskih izolatov, ki je osnovan na raznolikosti alelov dobljenih z metodo MIRU-VNTR/24 in nakazuje hipotetično filogenetsko sorodnost slovenskih izolatov. Razdalja med dvema skupinama je odvisna od alelne raznolikosti. Najkrajša razdalja in najmočnejša jakost črte predstavlja razliko enega alela. Z temno rdečo barvo je označena genetska linija Haarlem, z zeleno linija T, z rumenim obročem linija S, s temnomodrim obročem T4-CEV1, s svetlomodrim obročem LAM in z rdečim obročem SLOV1.....71
- Slika 23: Ujemanje vseh treh tipizacijskih metod (MIRU-VNTR/24, spoligotipizacija, RFLP IS6110) pri 131 izolatih in 23 epidemiološko povezanih genetskih družinah. Dendrogram UPGMA je bil narejen na metodi MIRU-VNTR/24.....78
- Slika 24: Genetska družina NSI-MV-00094 obsega 4 izolate. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP IS 6110. Dva izolata sta epidemiološko povezana. Ustrezno ju povežejo vse tri metode. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati MIRU-VNTR in Spoligotipizacije le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....80
- Slika 25: Genetska družina NSI-MV-00099. Rezultati spoligotipizacije so enaki rezultatu metode MIRU-VNTR/24, vsi imajo enak genotip. Metoda RFLP razdeli izolate v 12 enakih in 3, ki se razlikujejo od prvih 12. Epidemiološko povezani so vsi znotraj skupine 12 genotipov. Preostali trije izolati imajo enak MIRU-VNTR genotip, vendar pri njih nismo našli nobene epidemiološke povezave. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....82
- Slika 26: Genetska družina NSI-MV-00006. Rezultat spoligotipizacije so štirje različni genotipi v primerjavi z metode MIRU-VNTR/24. Metoda RFLP razdeli izolate v pet različnih genotipov. Izolati, ki so epidemiološko povezani (F2846, F2830 in F3262) so z vsemi metodami povezani v genetsko družino. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR



(A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....83

Slika 27: Genetska družina NSI-MV-00049. Rezultat spoligotipizacije je enak v primerjavi z metodo MIRU-VNTR/24. Metoda RFLP razdeli izolate v dve skupini. Prva s petimi izolati, ki imajo enak genotip in druga z enim izolatoma, ki se razlikuje od ostalih. Izolati, ki so epidemiološko povezani (F3270, F3281 in F3338) so z vsemi metodami povezani v genetsko družino. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....84

Slika 28: Genetska družina NSI-MV-00053 je epidemiološko povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Vseh 6 izolatov je epidemiološko povezanih. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....85

Slika 29: Genetska družina NSI-MV-00027. Rezultat spoligotipizacije je enak v primerjavi z metodo MIRU-VNTR/24. Metoda RFLP razdeli izolate v štiri različne genotipe. Izolati, ki so epidemiološko povezani (F3116, F3249 in F3083) so z vsemi metodami povezani v genetsko družino. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....86

Slika 30: Genetska družina NSI-MV-00032. V GD NSI-MV-00032 je 17 izolatov izmed katerih sta le dva epidemiološko povezana (sorodstvena vez - mož in žena, F2814 in F3206). Epidemiološki podatki omenjenima izolatoma dodajo še tretjega, ki je na osnovi metode MIRU-VNTR/24 uvrščen v GD NSI-MV-272 (ni prikazano na sliki, F3229). Izolat F3229 ima le en lokus razlike z GD NSI-MV-00032 in ker je epidemiološko povezan ga lahko uvrstimo v GD NSI-MV-00032. Ostali dve metodi ga uvrstita v isto genetsko družino k prvima dvema izolatoma. Med omenjenimi tremi izolati so dokazane

sorodstvene vezi. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....88

Slika 31: Genetska družina NSI-MV-00031 in NSI-MV-00032. V GD NSI-MV-00031 sta le dva izolata (F3194 in F3153) in oba sta povezana z epidemiološkimi podatki (prijateljici). GD NSI-MV-00032 in epidemiološko povezani izolati so opisani v predhodni sliki. Genotipi genetskih družin NSI-MV-00031 in GD NSI-MV-00032 se glede na metodo MIRU-VNTR/24 razlikujejo le v enem lokusu. V kolikor bi našli epidemiološko povezanost med njimi, bi jih lahko uvrstili v enotno genetsko družino. Zaenkrat še nismo našli epidemioloških podatkov, ki bi to potrdili. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....90

Slika 32: Genetska družina NSI-MV-00239, epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....92

Slika 33: Genetska družina NSI-MV-00029, epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP IS 6110. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....93

Slika 34: Genetska družina NSI-MV-00309, epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.....94

- Slika 35: Statistična analiza primerjave med številom namnoženih lokusov in mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev tipiziranih z metodo MIRU-VNTR/24 (n=26). Linearna povezanost med uspešnostjo tipiziranega števila lokusov in višino mikroskopske pozitivnosti je prikazana s premico in koeficientom R. Pozitivnost mikroskopije je označena po sledečem zaporedju 3+ (> 10 bacilov/vidno polje); 2+ (1–10 bacilov/ vidno polje); 1+ (10–99 bacilov/100 vidnih polj); 2AFB (7–9 bacilov / 100 vidnih polj), and 1 AFB (3–6 bacilov/100 vidnih polj).....96
- Slika 36: Statistična analiza primerjave med številom namnoženih lokusov in mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev tipiziranih z metodo MIRU-VNTR/24 (n=53). Linearna povezanost med uspešnostjo tipiziranega števila lokusov in višino mikroskopske pozitivnosti je prikazana s premico in koeficientom R. Pozitivnost mikroskopije je označena po sledečem zaporedju 3+ (> 10 bacilov/vidno polje); 2+ (1–10 bacilov/ vidno polje); 1+ (10–99 bacilov/100 vidnih polj); 2AFB (7–9 bacilov / 100 vidnih polj), and 1 AFB (3–6 bacilov/100 vidnih polj).....98
- Slika 37: Rezultat tipizacije MIRU-VNTR/24 79 vzorcev odvzetih 26 bolnikom s tuberkulozo v povezavi z mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev. Pozitivnost mikroskopije je označena po sledečem zaporedju 3+ (> 10 bacilov/vidno polje); 2+ (1–10 bacilov/ vidno polje); 1+ (10–99 bacilov/100 vidnih polj); 2AFB (7–9 bacilov / 100 vidnih polj), and 1 AFB (3–6 bacilov/100 vidnih polj).....99

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Pravilnik o postopkih genotipizacije izolatov bacilov *M. tuberculosis* z vidika zagotovitve varne obdelave podatkov.
- Priloga B: Analiza 576 slovenskih izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* (triletna analiza) z metodo MIRU-VNTR/24.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAL	brohoalveolarna lavaža (angl. <i>bronchoalveolar lavage fluid</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DR	mesto »DR« (angl. <i>direct repeat region</i> )
ECDC	evropski center za nadzor bolezni (angl. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
GD	genetska družina (angl. <i>cluster</i> )
HGDI	indeks po Hunter-Gastonu (angl. <i>Hunter-Gaston discriminatory index</i> )
IS	insercijska zaporedja (angl. <i>insertion sequence</i> )
LOTB	latentna okužba s tuberkulozo
MDR-TB	večkratnoodporna oblika tuberkuloze (angl. <i>multi-drug resistant Tuberculosis</i> )
XDR-TB	razširjen spekter odpornosti tuberkuloze (angl. <i>extended-drug resistant Tuberculosis</i> )
XXDR-TB	razširjen spekter odpornosti tuberkuloze (angl. <i>extremely-drug resistant Tuberculosis</i> )
TDR-TB	popolnoma odporna tuberkuloza (angl. <i>totaly-drug resistant Tuberculosis</i> )
MIRU-VNTR	razpršene ponavljajoče se enote v mikobakterijskem genomu - spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. <i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Numbers of Tandem Repeats</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
RFLP	metoda polimorfizma dolžine restrikcijskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SpolDB4	mednarodna baza spoligovzorcev
TB	tuberkuloza (angl. <i>tuberculosis</i> )
WGS	sekveniranje celotnega genoma (angl. <i>whole genome sequencing</i> )
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (angl. <i>world health organization</i> )

## 1 UVOD

Mikobakterija *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) je ena izmed najbolj nevarnih bakterijskih povzročiteljev okužb pri človeku v svetovnem merilu in povzroča nalezljivo bolezen tuberkulozo, zaradi katere vsako leto zboli približno 9 milijonov in umre 1,5 milijona ljudi (WHO, 2014). Strokovnjaki ocenjujejo, da je tretjina svetovnega prebivalstva okužena s to bakterijo, kar predstavlja velik rezervoar za omenjeno bolezen. Problematika tuberkuloze v svetu se je še povečala s pojavom večkrat odpornih izolatov bacilov tuberkuloze in z razširitvijo virusa imunske pomanjkljivosti (HIV), ki oslabi imunski status in omogoča večjo dovzetnost bolnikov za okužbe z bacili tuberkuloze. Molekularna genotipizacija bakterij iz sklopa *M. tuberculosis* je zelo pripomogla k razumevanju in učinkovitem nadzoru nad širjenjem tuberkuloze.

Razvoj molekularne biologije in genetike sta v zadnjih desetletjih omogočila razvoj sodobnih molekularno epidemioloških metod, to je metod molekularne genotipizacije, s katerimi lahko danes razlikujemo bacile tuberkuloze med seboj in odkrivamo do sedaj neznane epidemiološke povezave. Omogočajo nam ugotavljanje pričakovanih in nepričakovanih prenosov okužbe z bacili tuberkuloze med bolniki, ugotavljanje uspešnosti zdravljenja tuberkuloze, ponoven izbruh tuberkuloze, ponovne okužbe z novimi izolati bacilov tuberkuloze ali celo pojav laboratorijskih navzkrižnih kontaminacij (Barnes in Cave, 2003; Brudej in sod., 2006; Supply in sod., 2001). *M. tuberculosis* je zelo počasi rastoča bakterija zato je še toliko bolj pomembno, da so metode s katerimi jo odkrijemo, identificiramo in tipiziramo hitre in zanesljive.

Za tipizacijo bacilov *M. tuberculosis* so na voljo različne metode molekularne genotipizacije, ki se po svojih lastnostih in zahtevah zelo razlikujejo. Metoda polimorfizma dolžine restriksijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ima v svoji preteklosti številne različice, saj imajo različne vrste mikobakterij v svoj genom vključena različna insercijska zaporedja (angl. insertion sequence, IS). Nekatera insercijska zaporedja so prisotna v številnih kopijah in so vrstno specifična. Zaporedje IS6110, značilno in specifično za bakterijo iz sklopa *M. tuberculosis* se je izkazalo za najboljše pri razlikovanju izolatov *M. tuberculosis* z uporabo metode RFLP.

Metoda molekularne genotipizacije RFLP IS6110 (RFLP), ki je v zadnjem desetletju predstavljala zlati standard, je bila prvič opisana v letu 1993 (van Embden in sod., 1993). Metoda je mednarodno standardizirana in daje zelo dobre možnosti za razvrščanje bacilov tuberkuloze. Njena največja pomanjkljivost je, da zanjo potrebujemo veliko količino bakterijske kulture, je izvedbeno zelo zahtevna in ne loči zadovoljivo med seboj izolatov, ki imajo manj kot pet kopij omenjene sekvence, zato so v takih primerih za učinkovito tipizacijo potrebne dodatne metode molekularne genotipizacije (Prodingler, 2007; van Soolingen in sod., 2002). Velika količina bakterijske kulture in zahtevna izvedba sta glavni vzrok za časovno dolgotrajen postopek. Rezultat tipizacije je na voljo zelo pozno, ko je bolnik že izven bolnišnične oskrbe in tako zdravstveno osebje z njim ne more več preko osebnega stika ugotavljati možnih načinov okužbe in prenosa.

Zaradi lažje prepoznave in ugotavljanja pogostosti svetovno razširjenih genetskih družin (npr. genetska linija Beijing, Haarlem, LAM) se je zelo dobro uveljavila metoda spoligotipizacije, ki je po svoji naravi enostavna, hitra in ponovljiva. Je metoda, ki se uporablja za tipizacijo izolatov *M. tuberculosis* z manj kot petimi kopijami insercijskih sekvenc IS6110 in ima med genotipizacijskimi metodami pomembno mesto, saj lahko zelo hitro in enostavno prepozna zelo pomembne, invazivne in večkrat odporne izolate iz sklopa *M. tuberculosis* (Brudej in sod., 2006; Streicher in sod., 2007). Ugotavlja polimorfizem na specifičnem delu kromosomalnega lokusa imenovanega »mesto DR« (angl. Direct Repeat region). Rezultat metode je prisotnost oziroma odsotnost 43 specifičnih zaporedij DNK v obliki zaporedja pik (pozitivna hibridizacija) in praznih prostorov (negativna hibridizacija). Nadomestna oblika zapisa rezultata je oktalna koda oziroma mednarodno ime/številka določena z mednarodno bazo spoligovzorcev (SpolDB4). Rezultati metode spoligotipizacije so na voljo relativno hitro, vendar je njena moč razlikovanja bacilov tuberkuloze zelo nizka.

Francoski raziskovalec Philip Supply je s sodelavci razvil in standardiziral metodo molekularne genotipizacije z imenom MIRU-VNTR (angl. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Numbers of Tandem Repeats, razpršene ponavljajoče se enote v mikobakterijskem genomu - spremenljivo število tandemskih ponovitev), ki naj bi zadostila zahtevam uporabnikov (Supply in sod., 2006). Metoda temelji na pomnoževanju

specifičnih zaporedij na določenih lokusih. Optimizacija metode je pokazala, da tipizacija 24 lokusov omogoča visok nivo razlikovanja izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*. Dolžina ponovljive sekvence je znana, zato velikost amplikona odraža število MIRU-VNTR kopij. Metoda je tehnično fleksibilna, saj jo lahko izvedemo s pomočjo gelske ali kapilarne elektroforeze. Je tudi hitra, enostavna, njena moč razlikovanja med izolati naj bi bila zadostna. Njena največja prednost je numeričen prikaz genotipa, kar omogoča enostavno primerjavo rezultatov med laboratoriji v svetu (Supply in sod., 2006). Metoda MIRU-VNTR 24 lokusov (MIRU-VNTR/24) se tako v mednarodnem merilu vse bolj uveljavlja za tipizacijo bacilov tuberkuloze (Supply in sod., 2006; Allix-Beguec in sod., 2008a).

Primarni cilj naše raziskave je bil primerjalna analiza in ovrednotenje treh različnih metod tipizacije bacilov tuberkuloze: RFLP, spoligotipizacije in MIRU-VNTR/24.



## 1.1 NAMEN DELA

Z doktorsko nalogo smo želeli ovrednotiti tri različne metode tipizacije bacilov tuberkuloze, ki so v svetu trenutno najbolj pogosto uporabljene; RFLP, metoda spoligotipizacije in MIRU-VNTR/24.

Primerjalno analizo smo želeli uporabiti za naslednje namene:

- Raziskati vrednost posamezne metode genotipizacije za triletno obdobje na vseh izolatih na področju ene države.
- Določiti genetske družine s posamezno metodo genotipizacije.
- Analizirati že znane genetske družine oz. epidemiološko raziskane mikroepidemije tuberkuloze v Sloveniji (že analizirane z metodo RFLP) in jih povezati z rezultati analiz genetskih družin preostalih dveh metod genotipizacije (metoda spoligotipizacije in MIRU-VNTR/24).
- Analizirati rezultate dobljene z metodo tipizacije MIRU-VNTR/24 in jih povezati s podatki klasične epidemiologije. Na osnovi ugotovitev opredeliti uporabno vrednost te metode.
- Izdelati nove smernice za genotipizacijo bacilov tuberkuloze v Sloveniji.
- Dokazati, da je tipizacija z metodo MIRU-VNTR/24 možna tudi neposredno iz mikroskopsko pozitivnih vzorcev, kar bo zelo skrajšalo čas do rezultata tipizacije in pripomoglo k še učinkovitejšemu nadzoru nad prenosom bacilov tuberkuloze.

## 1.2 HIPOTEZE

V sklopu doktorske disertacije smo želeli potrditi naslednje delovne hipoteze:

- Genotipizacijska metoda MIRU-VNTR/24 ima dovolj visoko tipizacijsko moč, da postane v Sloveniji metoda izbora genotipizacije izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*.
- Genotipizacijska metoda MIRU-VNTR/24 spremeni genetske družine opredeljene z metodo RFLP izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*. Nova opredelitev ustreza epidemiološkim okoliščinam.
- Z genotipizacijsko metodo MIRU-VNTR/24 je mogoče tipizirati izolate iz sklopa *M. tuberculosis* neposredno iz kliničnih vzorcev.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA GENOTIPIZACIJE

Začetki genotipizacije bacilov tuberkuloze segajo v osemdeseta leta prejšnjega stoletja, ko sta bila občutljivost izolatov za protimikrobna sredstva in bakterijski fagi edina načina, kako med seboj razlikovati bacile tuberkuloze (Crawford in Bates, 1985; van Soolingen in sod., 2001). Razvoj je šel v smeri razlikovanja izolatov mikobakterij z molekularnimi metodami. Ena prvih metod je bila metoda analize z restrikcijскими endonukleazami (angl. Restriction Endonuclease Analysis, REA) (Collins in Lisle, 1984), sledile so ji različne oblike metode RFLP: RFLP (Thierry in sod., 1990; van Soolingen in sod., 1994), RFLP *IS1081* (van Soolingen in sod., 1992), RFLP DR (van Soolingen in sod., 1993) in poskusi uveljavljanja metode gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) (Zhang in sod., 1992; Singh in sod., 1999). Na področju metod, ki temeljijo na verižni reakciji pomnoževanja DNK s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR) je bila pestrost načina tipizacije bacilov tuberkuloze še večja. Med njimi so najpomembnejše metoda verižne reakcije s polimerazo in mešanim povezovalcem (angl. mixed-linker PCR, ML-PCR) (Haas in sod., 1993), metoda verižne reakcije z ligazo (angl. ligation-mediated PCR, LM-PCR) (Prod'hom in sod., 1997) ter metoda hitre verižne reakcije z ligazo (angl. fast ligation-mediated PCR, FliP) (Reisig in sod., 2005). Najbolj obetavne rezultate sta pokazali metodi VNTR (angl. Variable Numbers Tandem Repeats, variabilno število tandemskih ponovitev) (Frothingham in sod., 1998) in metoda spoligotipizacije (Kamerbeek in sod., 1997). Skupen vsem tem metodam je bil le en cilj, zadovoljivo razlikovati bacile tuberkuloze med seboj.

Pomembno je poudariti, da vsaka metoda molekularne genotipizacije glede na svoje označevalce določa genetske družine. Ali so genetske družine pravilno definirane ali ne, lahko ugotovimo šele, ko rezultatom genotipizacije pridružimo epidemiološke podatke o prenosih bacilov tuberkuloze med posamezniki in takrat lahko govorimo o mikroepidemijah. Pojem genetske družine in mikroepidemije je pri vseh omenjenih metodah molekularne genotipizacije definiran enako in je podrobneje opisan v poglavju metod.

Leta 1993 je bil objavljen članek v katerem je van Embden in sod. predlagal standardizacijo metode RFLP. Z leti so jo številni laboratoriji v svetu prevzeli kot vodilno metodo za tipizacijo bacilov tuberkuloze in zaradi svoje sposobnosti ločevanja bacilov tuberkuloze je kmalu postala mednarodno standardizirana in metoda izbora v laboratorijih po vsem svetu (van Embden in sod., 1993).

Genotipizacijo bacilov tuberkuloze v Sloveniji je Žolnir s sod. uvedla že leta 1999, ko je na osnovi metode RFLP dokazala številne dejavnike in načine prenosa bacilov tuberkuloze (Žolnir-Dovč in sod., 2003; Žolnir-Dovč, 2004). Metoda se je izkazala za zelo učinkovito orodje s katerim lahko odkrivamo neznane epidemiološke povezave in nadziramo prenos bacilov tuberkuloze v Sloveniji. Analiza podatkov je pokazala, da pozno odkrit ali pri zdravljenju nesodelujoč bolnik lahko povzroči mikroepidemijo tuberkuloze v kraju bivanja ali v različnih ustanovah, prav tako so z rezultati genotipizacije dokazali bolnišnični prenos proti zdravilom odporne tuberkuloze in prenos bacilov tuberkuloze z bronhoskopom. Izkazalo se je, da so v Sloveniji gostinski objekti najpomembnejše mesto prenosa bacilov tuberkuloze (Žolnir-Dovč in sod., 2003; Žolnir-Dovč, 2004). V povezavi z vsemi novimi spoznanji je bilo sprejetih vrsto ukrepov, ki so omogočili odkrivanje in preprečevanje tovrstnih prenosov, posledično pa se je tudi incidenca tuberkuloze v Sloveniji znižala (Preglednica 1). Zaradi zahtevnosti metode RFLP, so v mnogih državah sveta za genotipizacijo uporabljali enostavnejšo metodo, to je metodo spoligotipizacije, ki je omogočila hitrejšo genotipizacijo. Vendar se je izkazalo, da metoda v številnih delih sveta nima zadostne moči razlikovanja med izolati iz sklopa *M. tuberculosis* (Kamerbeek in sod., 1997; Van Deutekom in sod., 2005; Oeleman in sod., 2007; Alix-Beguec in sod., 2008a; Valcheva in sod., 2008; Jiao in sod., 2008; Glebremichael in sod., 2010; Shamputa in sod., 2010; Christianson in sod., 2010; Roetzer in sod., 2011; Varma-Basil in sod., 2011; Vadwai in sod., 2012; Aleksić in sod., 2013; Roetzer in sod., 2013; De Beer in sod., 2013 in Jonsson in sod., 2014). S standardizacijo metode MIRU-VNTR/24 v letu 2006 je ta postala vedno bolj uveljavljena metoda za tipizacijo bacilov tuberkuloze po svetu (Supply in sod., 2006; Allix-Beguec in sod., 2008a). Metoda je sprva temeljila na genotipizaciji 12 različnih lokusov, katerim so z optimizacijo dodali še 3. Danes je metoda standardizirana za 24 različnih lokusov. Je tehnično prilagodljiva, hitrejša od metode RFLP in izvedljiva že z uporabo ekstrakcije DNK *M. tuberculosis* iz zelo zgodnjih bakterijskih kultur (Supply in

sod., 2006; Allix-Beguec in sod., 2008a; de Beer in sod., 2012). Prve analize podatkov so pokazale, da ima zelo visoko moč razlikovanja med izolati iz sklopa *M. tuberculosis*. Po drugi strani je raziskava, ki jo je predstavila Kremer s sodelavci (Kremer in sod., 2005), pokazala visoko povezavo med vsemi tremi omenjenimi metodami genotipizacije: RFLP, spoligotipizacija in MIRU-VNTR/24. V svojem jedru nakazuje, da je moč razlikovanja posamezne genotipizacijske metode med izolati iz sklopa *M. tuberculosis* relativna in odvisna od izbora genotipiziranih izolatov. S tem nakazuje, da metoda MIRU-VNTR/24 v posameznih primerih, sama po sebi ne zadostuje za dokazovanje nedavnih prenosov bacilov tuberkuloze. Zato so potrebne nadaljne analize in uporaba drugih metod genotipizacije v primeru, ko imamo dva povsem enaka genotipa (Kremer in sod., 2005).

Raziskavi v Nemčiji (Oelemann in sod., 2007) in Bolgariji (Valcheva in sod., 2008) sta pokazali, da ima metoda spoligotipizacije, sicer kot samostojna metoda, zelo nizko moč razlikovanja med izolati iz sklopa *M. tuberculosis*, vendar ima v kombinaciji z metodo MIRU-VNTR/24 velik pomen. Z metodo MIRU-VNTR/24 opredeljene genetske družine je metoda spoligotipizacije razporedila drugače in izolate uvrstila v nove genetske družine, ki so bile primerljive genetskim družinam, dobljenim z metodo RFLP. Moč razlikovanja med izolati iz sklopa *M. tuberculosis* je v primeru združitve obeh metod genotipizacije zato večja in se zelo približa moči, ki jo ima metoda RFLP (Allix-Beguec in sod., 2008a; Roetzer in sod., 2011; Bidovec-Stojkovic in sod., 2011; Christianson in sod., 2010).

Obsežna nizozemska retrospektivna raziskava je pokazala, da je razlika med genotipi v enem lokusu v visokem odstotku signifikantna in pomeni dva različna genotipa. V posameznih primerih pa je razlika v enem lokusu med genotipi lahko povsem nepomembna, saj je bil pri omenjenih izolatih epidemiološko dokazan prenos bacilov tuberkuloze in torej genotip z razliko enega lokusa uvrščen v genetsko družino s katero ni imel povsem identičnega genotipa (Van Deutekom in sod., 2005).

Večina raziskav nakazuje, da je kombinacija dveh metod molekularne genotipizacije katerih osnova je metoda PCR (MIRU-VNTR/24 in spoligotipizacija) optimalna, v primerjavi z metodo RFLP, saj skupaj dosejata visok nivo razlikovanja med izolati iz sklopa *M. tuberculosis*. Zaradi možnosti hitre in enostavne izvedbe omogočata rezultate

tipizacije še v času hospitalizacije bolnikov, kar bi omogočilo hitrejši in učinkovitejši nadzor nad prenosi bacilov tuberkuloze. O tem je bilo izvedenih precej študij po vsem svetu (van Deutekom in sod., 2005; Oelemann in sod., 2007; Allix-Beguec in sod., 2008a; Valcheva in sod., 2008; Jiaoin sod., 2008; Ghebremichael in sod., 2010; Roetzer in sod., 2011; Bidovec-Stojkovic in sod., 2011; de Beer in sod., 2013).

## 2.2 KLASIFIKACIJA MIKOBAKTERIJ

Sodobna sistematika razvršča rod *Mycobacterium* v skupino *Actinomycetales* in družino *Mycobacteriaceae*. Mikobakterije so aerobne, nesporogene, negibljive, rahlo zakrivljene ali ravne palčke, brez kapsul. Široke so med 0,2 in 0,6  $\mu\text{m}$ , dolge pa od 1-10  $\mu\text{m}$ . Morfologija kolonij je spremenljiva znotraj vrst; gladke, hrapave, pigmentirane, nepigmentirane. Celična stena mikobakterij določa njihovo zelo pomembno lastnost, to je odpornost proti kislinam (acidorezistentnost) in alkoholom (alkoholorezistentnost).

Rod *Mycobacterium* sta utemeljila Lehmann in Neumann leta 1896 in združuje patogene, pogojno patogene in nepatogene vrste. Večina mikobakterij živi v naravi in ne povzroča bolezni pri človeku. Patogenih je le nekaj izmed skupaj več kot 150 do sedaj opisanih vrst, zato je njihova identifikacija klinično pomembna (Tortoli, 2014). Bolezni, ki jih povzročajo mikobakterije pri človeku, s skupnim imenom imenujemo mikobakterioze.

Timpe in Runyon sta mikobakterije razdelila glede na hitrost rasti in izdelovanje pigmenta. Tako ločimo, počasi rastoče mikobakterije (za porast kolonij na gojišču potrebujejo več kot 7 dni) in hitro rastoče mikobakterije (za porast kolonij na gojišču potrebujejo manj kot 7 dni). Glede na izdelovanje pigmenta, sta mikobakterije razdelila v tri skupine: fotokromogene izdelujejo pigment samo na svetlobi, skotokromogene izdelujejo pigment v temi in na svetlobi in nekromogene, ki ne izdelujejo pigmenta. Za identifikacijo mikobakterij, je poleg hitrosti rasti in izdelovanja pigmenta, pomembna še optimalna temperatura rasti in biokemične lastnosti mikobakterij (Pfyffer in sod., 2003; Vincent in sod., 2003; Rastogi in sod., 2001).

V izjemnih okoliščinah je klinično pomembna katerakoli mikobakterija. Poleg obligatno patogenih mikobakterij je vsaj še 20 vrst mikobakterij, ki se občasno pojavljajo v povezavi z obolenji ljudi. Te imenujemo oportunistične ali netuberkulozne mikobakterije. Tuberkulozo pri sesalcih povzročajo predstavniki mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* (angl. *M. tuberculosis* complex; MTc): *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* in *M. pinnipedii* (Van Soolingen in sod., 2001; Aranaz in sod., 2003; Cousins in sod., 2003; Tortoli, 2006; Koeck in sod., 2010; Gehre in sod., 2013). Nedavno so bile opisane še tri nove vrste (Tortoli, 2014), ki jih prav tako uvrščamo v zgoraj omenjeni sklop: *M. mungi* (Alexander in sod., 2010), *M. orygis* (van Ingen in sod., 2012; van Ingen in sod., 2013), *M. suricattae* (Parsons in sod., 2013).

### 2.3 PATOGENOST MIKOBAKTERIJ

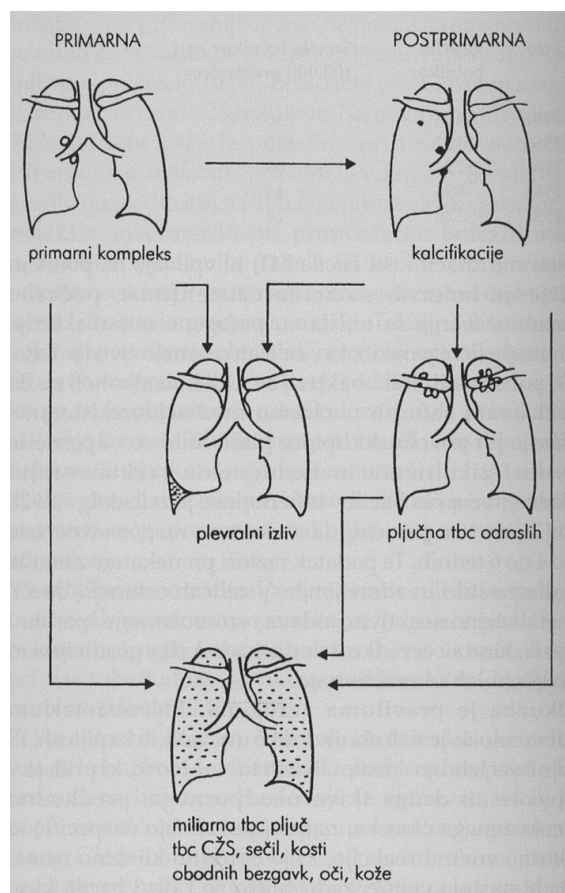
Tuberkuloza je nalezljiva bolezen in jo pri človeku tako v Sloveniji kot tudi v svetovnem merilu najpogosteje povzroča mikobakterija *M. tuberculosis*, redkeje *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum* in *M. leprae* (Shinnick in Good, 1994). *M. tuberculosis* povzroča tuberkulozo pri ljudeh, *M. bovis* pri govedu in ljudeh, *M. africanum* pri ljudeh in živalih v Afriki (Niemann in sod., 2000). Za večino izolatov *M. bovis* je značilna naravna odpornost proti antituberkulotiku PZA (pirazinamid) na osnovi katere je najlažje ločiti *M. tuberculosis* in *M. africanum*. Le manj kot 5 % izolatov *M. bovis* je občutljivih na PZA (Wayne in sod., 1991; Niemann in sod., 2000). *M. africanum* povzroča tuberkulozo na afriškem kontinentu in je razdeljen v dve večji skupini na osnovi svojega izvora. Delimo ga v *M. africanum* zahodno afriški podtip I in *M. africanum* vzhodno afriški podtip II (Niemann in sod., 2000; Brosch in sod., 2002). *M. caprae* je bil na začetku opisan kot podvrsta *M. tuberculosis* (Aranaz in sod., 1999), nato kot podvrsta *M. bovis* (Niemann in sod., 2002) in v letu 2003 prepoznan kot samostojna vrsta (Aranaz in sod., 2003). Vrsta je ima zelo podobne fenotipske lastnosti kot *M. bovis*, z izjemo občutljivosti na PZA, zato je ti dve vrsti zelo težko ločiti. Pogosteje jo izoliramo pri živalih (koze, srnjad, divji prašič, govedo, kamele in celo sibirski tiger), kot pri človeku (Tortoli, 2006). *M. microti* je povzročitelj tuberkuloze pri miših in drugih glodalcih. V literaturi se navajajo občasni primeri, ko povzroča tuberkulozo pri človeku. Izolirali so jo še pri mačkah, lamah, prašičih, konjih in psih (Kipar in sod., 2014).

Pogojno patogene ali oportunistične mikobakterije, povzročajo mikobakterioze pri imunsko oslabljenih ljudeh ali ljudeh s predhodno drugimi obolenji. Imenujemo jih tudi netuberkulozne mikobakterije (Pfyffer in sod., 2003).

## 2.4 TUBERKULOZA PRI ČLOVEKU

Tuberkuloza je bolezen, ki se prenaša kapljično, z aerosolom (1-5  $\mu\text{m}$  veliki delci, ki vsebujejo bacile). Kužni aerosol nastaja pri kašlju, kihanju, petju, govorjenju bolnikov s pljučno ali laringealno tuberkulozo. Nastaja tudi pri indukciji izmečka, pri bronhoskopiji in ostalih invazivnih posegih. Verjetnost prenosa je odvisna od koncentracije bacilov v zraku, bakterijske virulence, dolžine kontakta in imunskega odziva posameznika. Ostali pomembni dejavniki tveganja, ki vplivajo na dovzetnost za okužbo, so še: starost, okužba z virusom HIV, genetski vplivi, socialno-ekonomski dejavniki, poklicna izpostavljenost, življenjski slog in kajenje (Corbett in sod., 2003; Pai in sod., 2005; Biet in sod., 2005).

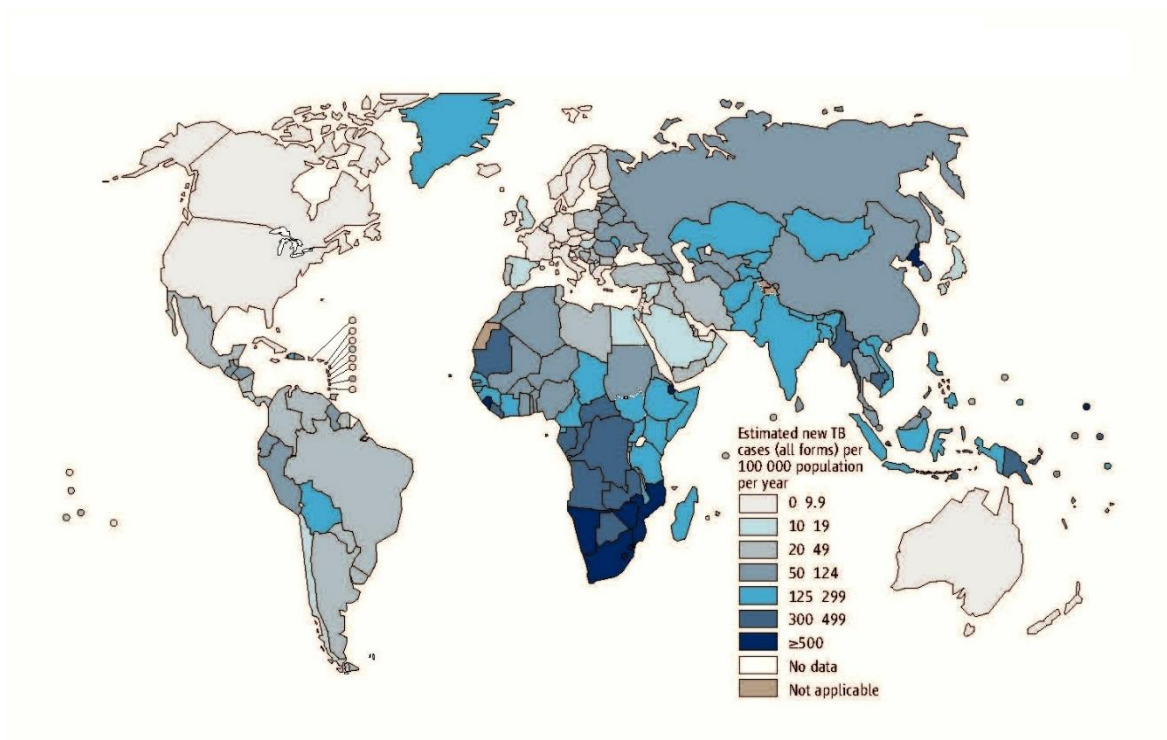




Slika 1: Razvoj in oblike tuberkuloze pri človeku (Košnik in sod., 2011).  
Figure 1: Development and forms of tuberculosis in humans (Košnik et al., 2011).

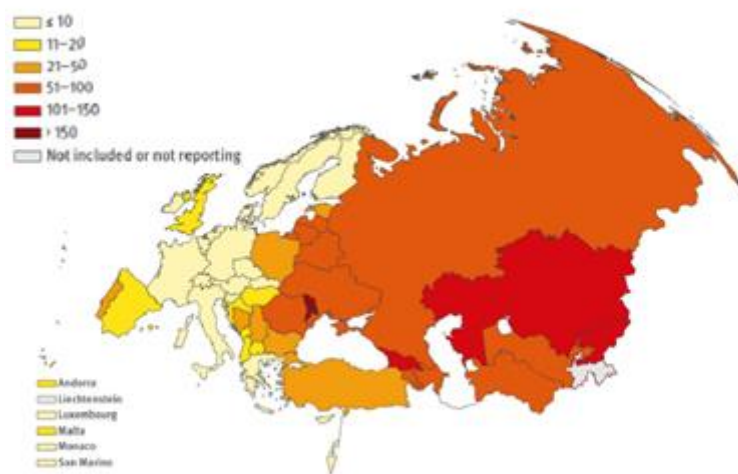
Tuberkuloza je počasi napredujoča bolezen, saj bakterije iz sklopa *M. tuberculosis* spadajo v skupino počasi rastočih mikobakterij. Za njih je značilna podvojitve v 20-24h, zato se celična imunost razvije šele po 2-8 tednih (Cole in sod., 1998). Bolnik je najverjetneje kužen, če ima pljučno tuberkulozo ali tuberkulozo dihalnih poti: laringealna, endobronhialna tuberkuloza. Do okužbe pride v 15-30 % pri ljudeh, ki so bili v tesnih kontaktih z bolnikom s tuberkulozo (Slika 1). Latentna okužba s tuberkulozo (LOTB) je asimptomatska. Le pri majhnem številu oseb pride do razvoja bolezni takoj po okužbi – primarna progresija. V prvih dveh letih LOTB pri 5 % napreduje v aktivno bolezen. Tveganje za razvoj bolezni, v celotnem življenju, je pri okuženih osebah 10-odstotno (Dye in in Williams, 2008; Denholm in McBryde, 2010; Košnik in sod., 2011; Diel in sod., 2012). Za odkrivanje LTBO se je v preteklosti uporabljal tuberkulinski kožni test, danes ga zamenjujejo gamainterferonski testi (npr. test Quantiferon-TB Gold), ki merijo imunski odziv organizma proti *M. tuberculosis*.

## 2.5 EPIDEMIOLOGIJA TUBERKULOZE



Slika 2: Incidenca tuberkuloze v svetu v letu 2012 (ECDC, 2014).

Figure 2: The incidence of tuberculosis in the world in 2012 (ECDC, 2014).



Slika 3: Incidenca tuberkuloze v Evropi v letu 2012 (ECDC, 2014).

Figure 3: The incidence of tuberculosis in Europe in 2012 (ECDC, 2014).

Tuberkuloza je v svetovnem merilu še vedno eden glavnih zdravstvenih problemov (Slika 2, Slika 3). Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je leta 1993, prvič v zgodovini svojega delovanja, razglasila epidemijo tuberkuloze za največji svetovni zdravstveni problem. V razvitem svetu so bili vzroki za naraščanje epidemije v upadu pozornosti in opuščanju programov za zdravljenje tuberkuloze. V nerazvitem svetu je glavni vzrok pomanjkanje sredstev za odkrivanje in zdravljenje tuberkuloze. Pomemben del porasta števila primerov tuberkuloze, tako v razvitem kot nerazvitem svetu, je posledica okužbe z virusom HIV in s tem povezane imunske oslabelosti. Z nepravilnim zdravljenjem in zlorabljanjem protituberkuloznih zdravil, se je pojavila tuberkuloza odporna proti več zdravilom. Večkratnoodporna (multirezistentna) tuberkuloza (MDR-TB, angl. Multi-Drug Resistant Tuberculosis) pomeni sočasno odpornost na rifampicin in izoniazid in predstavlja grožnjo vsemu človeštvu. Največja žarišča so v baltskih državah, Rusiji, Aziji in v Afriki. V zadnjih letih se pojavlja tudi vse večje število primerov tuberkuloze povzročene s izolati, ki so odporni proti vse več zdravilom (razširjen spekter odpornosti, angl. Extended-Drug Resistant Tuberculosis, XDR-TB; angl. Extremely-Drug Resistant Tuberculosis, XXDR-TB in angl. Totaly Drug Resistant Tuberculosis, TDR-TB) in so v povezavi z drugimi boleznimi in stanji, predvsem v zvezi z okužbo z virusom HIV, smrtni (Migliori in sod., 2007; Velayati in sod., 2009). Leta 2005 se je z vsemi ukrepi, porast tuberkuloze, prvič v zgodovini ukrepov proti njej, zaustavil in pričinja se upad števila primerov (WHO, 2008a; WHO, 2008b; ECDC, 2008).

Največji izziv nadaljnjemu uspešnemu zamejevanju bolezni, torej predstavlja tuberkuloza povzročena z odpornimi izolati in tuberkuloza v povezavi z okužbo z virusom HIV. V letu 2006 je bilo že 700.000 bolnikov s tuberkulozo testiranih na HIV, kar je veliko več kot leta 2002, ko jih je bilo testiranih samo 22.000. V letu 2013 je bilo zabeleženih 1,1 milijona bolnikov s tuberkulozo (13 %) okuženih z virusom HIV (WHO, 2014; ECDC, 2014). Največji odstotek (75 %) izhaja iz afriške regije.

Pomembno vlogo v boju proti tuberkulozi ima mreža nacionalnih in supranacionalnih referenčnih laboratorijev. Dobra laboratorijska diagnostika omogoča zgodnje odkrivanje kužnih bolnikov, kar pomembno pripomore k nadzoru tuberkuloze. Supranacionalni laboratoriji predstavljajo nadsacionalno mrežo, ki koordinira standarde laboratorijske

diagnostike in letno izvaja nadzor nacionalnih laboratorijev. Nacionalni referenčni laboratoriji pa imajo nalogo nadzora in učinkovitosti laboratorijske diagnostike znotraj posamezne države.

Iz poročil organizacij, ki se trudijo zaježiti širjenje tuberkuloze po svetu (WHO, ECDC), je razvidno, da je za nadaljevanje ukrepov proti tuberkulozi, v vsaki državi potrebno zagotoviti politično podporo vlade, ki s svojim delovanjem omogoča izvajanje Nacionalnega programa za tuberkulozo. Posebno pozornost je potrebno usmeriti na preprečevanje večkratodporne tuberkuloze, tuberkuloze pri bolnikih okuženih s HIV in v skupinah, kjer obstaja povečano tveganje za okužbo s tuberkulozo ali neugoden izid zdravljenja (WHO, 2014; ECDC, 2014).

V Sloveniji, se je z letom 1996 poostiril in izpopolnil nadzor nad bolniki s tuberkulozo. V ta namen je bil popolnoma prenovljen Nacionalni program obvladovanja tuberkuloze (Program obvladovanja tuberkuloze, 2011). Vodilno vlogo pri tem je imela Klinika Golnik s svojimi tremi pomembnimi segmenti; Oddelek za zdravljenje bolnikov s tuberkulozo, Nacionalni referenčni laboratorij za mikobakterije in Register za tuberkulozo. Rezultati so vidni v pospešenem upadanju epidemije tuberkuloze. Od leta 1996, ko je bilo registriranih 28,3 primerov na 100.000 prebivalcev, smo do leta 2013 uspeli znižati obolevnost na 6,8 primerov na 100.000 prebivalcev (Preglednica 1). To nas danes uvršča med države z najnižjo obolevnostjo (Slika 2, Slika 3). Najpomembnejše spremembe, zapisane v nacionalnem programu so v izboljšanju epidemiološkega nadzora bolnikov s tuberkulozo in doslednejšem pregledovanju oseb, ki so bile v stiku s kužnimi bolniki. Uvedeno je bilo začetno zdravljenje s štirimi zdravili in neposredno nadzorovano prejetje zdravil, izboljšana je bakteriološka diagnostika, vključno z obveznim testiranjem občutljivosti bacilov tuberkuloze na zdravila, uvedena je bila molekularna tipizacija bacilov tuberkuloze, s katero lahko ugotavljamo smeri prenosa tuberkuloze. Poleg dosedanjega pasivnega odkrivanja tuberkuloze je nacionalni program predvidel tudi aktivno iskanje novih primerov znotraj ogroženih skupin (starejši ljudje, alkoholiki, brezdomci, priseljenci iz držav, kjer je obolevnost za tuberkulozo visoka in okuženi s HIV). Cilj nacionalnega programa je bil doseči upad obolevnosti na manj kot 10 bolnikov na 100.000 prebivalcev

do leta 2015, kar nam je tudi uspelo (Nacionalni program obvladovanja tuberkuloze, 2011; Preglednica 1).

Preglednica 1: Incidenca tuberkuloze v Sloveniji od leta 1996 do leta 2013 (Register za tuberkulozo, 2014a).  
Table 1: The incidence of tuberculosis in Slovenia from 1996 to 2013 (Register for tuberculosis, 2014a).

Leto	Število novoodkritih bolnikov s tuberkulozo	Incidenca tuberkuloze (št. bolnikov s tuberkulozo/100.000 prebivalcev)
1996	563	28,27
1997	483	24,31
1998	449	22,65
1999	438	22,06
2000	380	19,09
2001	372	18,69
2002	350	17,54
2003	293	14,67
2004	263	13,17
2005	278	13,89
2006	215	10,70
2007	218	10,80
2008	212	10,40
2009	188	9,20
2010	172	8,40
2011	192	9,35
2012	138	6,71
2013	140	6,80

V nacionalnem programu je tudi zelo natančno opredeljena vloga Nacionalnega referenčnega laboratorija za mikobakterije (NRLTB). NRLTB je dolžan spremljati pojav odpornosti bakterij iz sklopa *M. tuberculosis*, za posamezna protituberkulozna zdravila, pri vseh novoodkritih bolnikih s tuberkulozo pa je laboratorij dolžan z metodami molekularne genotipizacije aktivno sodelovati pri odkrivanju mikroepidemij tuberkuloze v Sloveniji (Priloga A). V ta namen se v NRLTB izvaja molekularna genotipizacija bacilov tuberkuloze že od leta 2000, za vse bolnike v državi. Prva metoda izbora za genotipizacijo bacilov tuberkuloze je bila metoda RFLP. Rezultati so pokazali, da lahko bolniki zaradi

prekinitve zdravljenja povzročijo obsežne mikroepidemije tuberkuloze. Slabo sodelujoč bolnik ne škodi samo sebi, pač pa tudi ljudem v okolici. Takšnim bolnikom je potrebno zagotoviti podaljšano zdravljenje v bolnišnici, ali pa prejetje zdravil na domu pod nadzorom zdravstvenega osebja. Zato je toliko pomembnejše, da z metodami molekularne genotipizacije čim hitreje odkrijemo prenose bacilov tuberkuloze med bolniki, po možnosti še v obdobju njihovega zdravljenja v bolnišnici. Pri tem nam pomaga učinkovita metoda, ki hitro in dovolj natančno omogoči ugotavljanje prenosa bacilov tuberkuloze. V ta namen NRLTB nenehno sledi razvoju molekularnih metod genotipizacije in želi čim bolj skrajšati čas od odkritja bolnika do rezultata molekularne genotipizacije.

## 2.6 METODE MOLEKULARNE GENOTIPIZACIJE

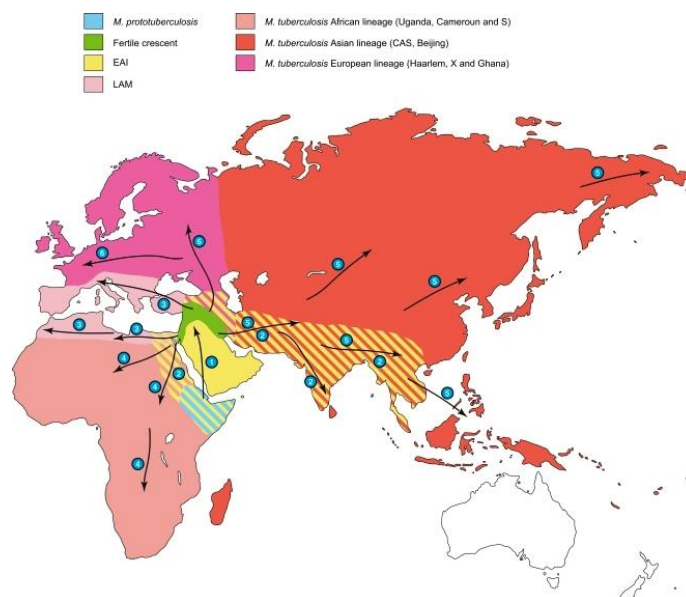
### 2.6.1 Razvoj genetskih linij iz sklopa *M. tuberculosis*

Sklop *M. tuberculosis* je sestavljen iz genetsko tesno povezanih bakterijskih podvrst, ki povzročajo tuberkulozo tako pri človeku, kot tudi pri živalih. Najnovejši podatki kažejo, da je nagnjenost za pridobitev odpornosti na zdravila in patogenost predstavnikov omenjenega sklopa, lahko povezana z njihovim genetskim in evolucijskim ozadjem. Torej je zelo pomembno razumevanje medsebojne povezanosti in dinamika razvoja genetskih linij predstavnikov iz sklopa *M. tuberculosis*. Kljub zelo veliki svetovni razširjenosti, je njihov evolucijski razvoj, še precej neznan in to je povezano predvsem z nezadovoljivimi genetskimi označevalci, poznanimi do sedaj. Raziskovalci so na podlagi polimorfizma posameznega nukleotida (SNP, angl. Single nucleotide polymorphism), postavili evolucijsko hipotezo univerzalne frekvence bakterijske mutacije, kjer so za osnovo vzeli hipotetičen čas, ko sta se v evoluciji razšli *Escherichia coli* (*E. coli*) in *Salmonella enterica* (*S. enterica*) (Ochman in Wilson, 1987). Ta hipoteza ni bila podprta s sedanjo geografsko razširjenostjo genetskih linij.

V novejših raziskavah so bili uporabljeni genetski označevalci, ki temeljijo na mikobakterijskih ponovljivih enotah (MIRU), ki naj bi natančneje določili časovno razhajanje, populacijsko raznolikost in širjenje predstavnikov iz sklopa *M. tuberculosis* širom po svetu. MIRU lokusi vsebujejo variabilno število tandemskih ponovitev (VNTR)

kar jim omogoča, da se uporabljajo kot zelo pomembni genotipizacijski označevalci (Supply in sod., 2006; Supply in sod., 2000; Wirth in sod., 2008). V primerjavi z določanjem nivoja genetske diverzitete in stopnje mutacij so zelo podobni človeškim mikrosatelitom, ki so široko uporabljeni v raziskavah populacijske genetike pri ljudeh (Rosenberg in sod., 2002). Podobno kot mikrosateliti, se MIRU vedejo, kot nekakšni selektivni nevtralni filogenetski markerji v primeru, da je uporabljenih zadostno število lokusov. S tovrstno analizo sta bili določeni dve večji svetovni genetski skupini; klad 1 in klad 2, ki sta se začeli razvijati vsaka v svojo smer pred več deset tisoč leti. Obe naj bi se razvili iz skupnega afriškega prednika imenovanega *M. prototuberculosis*. Klad 1 se je geografsko razdelil v ločene veje sledečih genetskih linij: Afriška linija (Uganda, Cameroon in S), Azijska linija (Beijing in CAS), Latinsko-Ameriška-Mediterska linija (LAM) in Afriško-Evropska linija (X, Ghana in Haarlem). Klad 2 pa vsebuje tako človeške, kot tudi živalske patogene mikobakterije iz sklopa *M. tuberculosis*, kjer je najmočnejša linija Vzhodno Azijsko-Indijska linija (EAI), ki naj bi imela svoj izvor pri človeku in se je nadalje v zgodovini razširila tudi na živalske vrste. Ta teorija zelo sovпада s trenutno svetovno razporeditvijo genetskih linij, kot so opisane in definirane v največji spoligobazi SpolDB4 (Brudej in sod., 2006) (Slika 4 in Slika 5) (Wirth in sod., 2008).

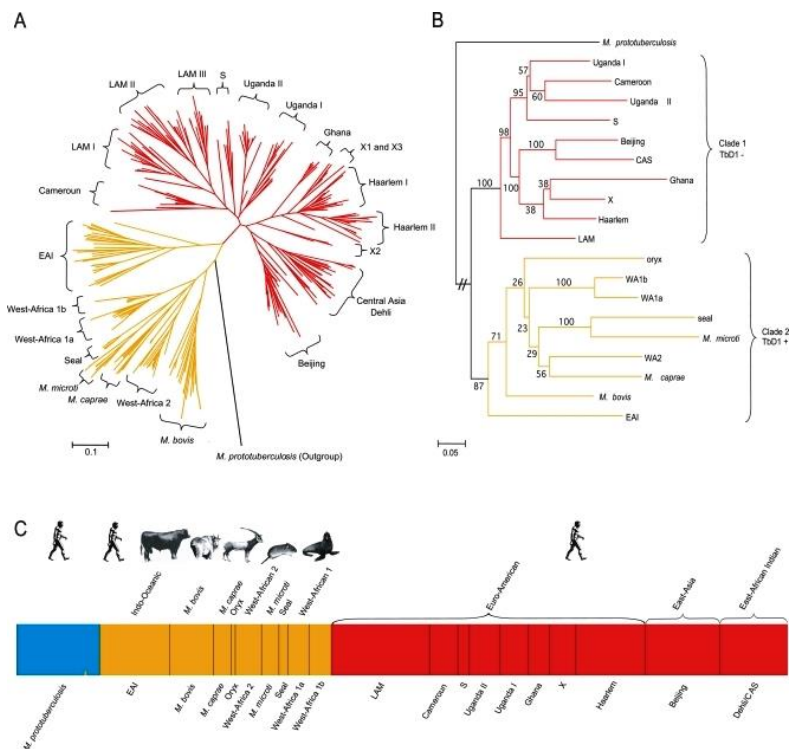
V zadnjem času v ospredje vstopa metoda določanja celotnega genoma bakterij (angl. whole genome sequencing, WGS). Le ta skuša še natančneje pojasniti izvor, širitev in prenose mikobakterij. Metoda se širi tudi na področje ne le genotipizacije bacilov tuberkuloze, ampak želi zajeti celotno področje mikobakterij, od prepoznavanja vrst, do določanja občutljivosti na protimikrobna zdravila. Raziskovalci se trudijo, z metodo WGS, nadomestiti celotno dosedanjo diagnostično pot na področju mikobakterij (Pankhurst in sod., 2015; Walker in sod., 2015).



Slika 4: Hipoteza evolucije bacilov *M. tuberculosis*. *M. prototuberculosis* naj bi bil prednik današnjih predstavnikov iz sklopa *M. tuberculosis* in naj bi se pojavil pred 40 000 leti v Mezopotamiji. Pred 10 000 leti naj bi se iz izvornega *M. prototuberculosis* razvili dve večji genetski liniji EAI in LAM. Pred 5 – 8 000 leti so se razvile lokalne oblike genetskih linij v povezanosti z migracijo; Afrika, Azija in Evropa (Wirth in sod., 2008).

Figure 4: The main migrations events are numbered and correspond to: 1, *M. prototuberculosis*, the ancestor of the MTBC, this bacterium reached the Fertile Crescent some 40,000 years ago by sea or land; 2 and 3, two distinct basal lineages arose, EAI and LAM and spread out of Mesopotamia some 10, 000 years ago; 4, 5 and 6, later on (8–5000 years ago) derived populations from clade 1 followed main human migration patterns to Africa, Asia and Europe, giving rise to locally adapted tubercle strains and further diversifications. Note that the depicted borders are “artificial” and are used for the demonstration. Global movements and intercontinental exchanges tend to blur this phylogenetic signal though strong enough to be detected nowadays (Wirth et al., 2008).

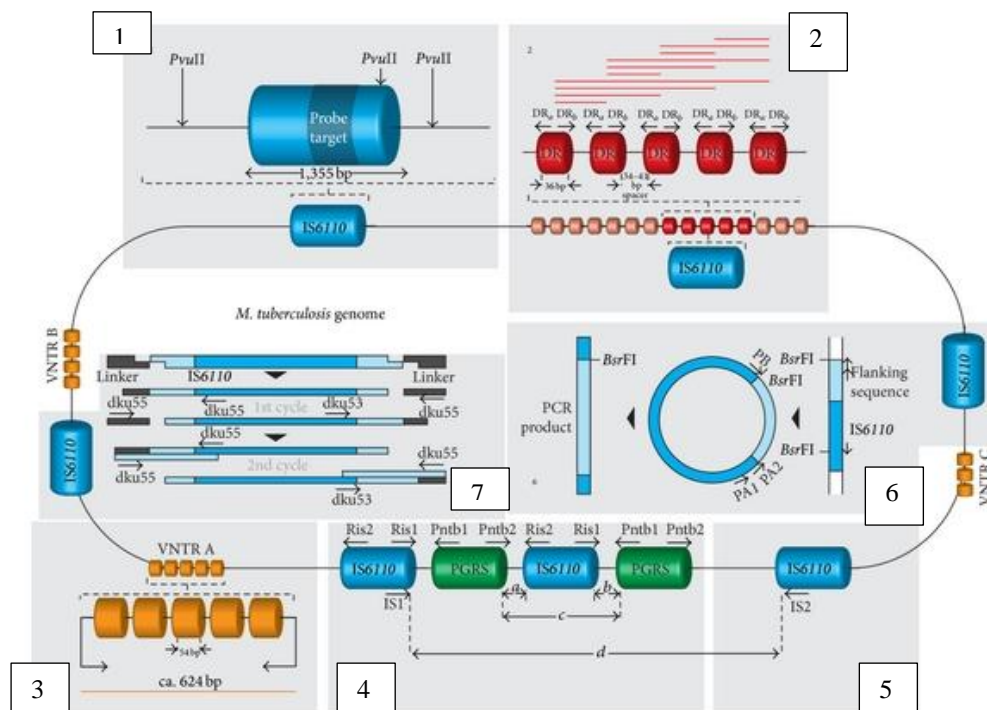




Slika 5: Evolucijski razvoj predstavnikov sklopa *M. tuberculosis*. (A) Genetska povezanost bacilov tuberkuloze na osnovi koeficienta sorodnosti po Nei-u. (B) Dendrogram sorodnosti predstavnikov iz sklopa *M. tuberculosis* s predpostavko, da vsi izhajajo iz skupnega prednika *M. prototuberculosis*. Dolžina veje dendrograma sovpada s sorodnostjo med posameznimi predstavniki sklopa. (C) Populacijska zgradba in razvoj svetovnih genetskih linij (Wirth in sod., 2008).

Figure 5: Evolutionary relationships of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. (A) Unrooted MIRU Neighbour-joining phenogram depicting genetic distance relationships among tubercle bacilli isolates based on Nei et al.'s  $D_A$  distances. (B) Rooted MIRU population Neighbour-joining tree based on genetic distance. *M. prototuberculosis* was used as an outgroup. Values on the nodes represent the percentage of bootstrap replicates over individuals ( $N=1000$ ) showing the particular nodes. Branch lengths are proportional to the genetic distance between the tubercle lineages. It is noteworthy that low bootstrap values within clade 2 prevent us from drawing further inferences on the branching order in this clade (see also main text). Wa, West-Africa. (C) Population structure of 20 MTBC clonal lineages using the no-admixture model, where  $K=3$ . Each colour represents one cluster, and the length of the color segment shows the strains' estimated proportion of membership in that cluster. Results shown are averages over 10 STRUCTURE runs. For clarity, strains codes are also given according to Gagneux et al. (2006). (Wirth et al., 2008)

## 2.6.2 Razvoj metod molekularne genotipizacije



Slika 6: Hipotetičen shematski prikaz kromosoma mikobakterije iz sklopa *M. tuberculosis*. (1) IS6110-RFLP, (2) spoligotipizacija, (3) MIRU-VNTR, (4, 5) dve tipizacijski metodi na osnovi PCR (dvojni ponovljivi element-DRE-PCR in amplitipizacija), (6) vgnezdena inverzna PCR (HIP) in (7) z ligacijo posredovan PCR (LM-PCR) (Jagielski in sod., 2014).

Figure 6: Schematic representation of the chromosome of a hypothetical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate with marked repetitive elements as targets for typing methods. Principle of those methods is pictorially outlined. (1) IS6110-RFLP typing, (2) spoligotyping, (3) variable numbers of tandem repeat loci (VNTR) of mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU), (4, 5) two PCR-based typing methods, that is, double repetitive-element PCR (DRE-PCR) and amplityping, are designed to amplify DNA between clusters of IS6110 and polymorphic GC-rich sequences (PGRS) or between clusters of IS6110 elements, respectively, (6) hemi nested inverse PCR (HIP) and (7) ligation mediated PCR (LM-PCR) (Jagielski et al., 2014).

Mobilni genetski elementi so se v zgodovini molekularne genotipizacije izkazali za zelo primerne elemente, s katerimi lahko učinkovito preučujemo genetske spremembe in razvoj mikobakterij. Te elemente imenujemo insercijska zaporedja (angl. insertion sequence, IS). To so kratki odseki DNK, ki lahko spreminjajo položaj, zato jih imenujemo transpozicijski oziroma mobilni elementi. Ti nosijo le genski zapis za beljakovine (transpozaze), ki so pomembne za spremembo položaja IS v genomu (Dale, 1995). IS so lahko vrstno specifična in so kot taka zelo primerna za epidemiološke raziskave. IS900 je bil odkrit pri

*M. paratuberculosis* (Green in sod., 1989), IS901 pri *M. avium* (Kunze in sod., 1992), IS6100 pri *M. fortuitum*, v izolatih bakterije *M. tuberculosis* in *M. bovis* pa so našli mobilni element IS6110 (Thierry in sod., 1990). V genomu mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* se lahko nahaja celo do 25 IS6110, največkrat se to zaporedje ponovi 8-20 krat (van Embden in sod., 1993; Van Soolingen in sod., 1991). Zaporedje IS6110, značilno in specifično za bakterije iz sklopa *M. tuberculosis* se je pokazalo za najboljše pri razlikovanju izolatov *M. tuberculosis*, z uporabo metode RFLP (RFLP) (Thierry in sod., 1990; Van Embden s sod 1993). Rezultat metode je fingerprint, nekakšen prstni odtis mikobakterije, ki prikazuje število in razporeditev IS6110 na njenem genomu. Izolati z identičnim fingerprint vzorcem se smatrajo za predstavnike istega klona in zato, najverjetneje predstavljajo epidemiološko povezane bolnike s tuberkulozo. Pri bolnikih, s tuberkulozo katerih bakterijski izolati imajo identično RFLP sliko, je najverjetneje prišlo do prenosa bacilov.

Za tipizacijo bakterij iz sklopa *M. tuberculosis* se je uporabljala tudi metoda RFLP IS1081. Omenjena IS lahko loči posamezne predstavnike znotraj sklopa *M. tuberculosis* (*M. bovis* BCG in *M. canetti*), vendar je njena moč razlikovanja precej nižja od RFLP (Van Soolingen in sod., 1992; Van Soolingen in sod., 1993). Ker IS6110 slabo razlikuje nekatere predstavnike sklopa *M. tuberculosis*, so raziskovalci iskali nove metode, s katerimi bi lahko pojasnili evolucijski razvoj in povezanost mikobakterij, ki povzročajo tuberkulozo. Po drugi strani je šel razvoj v smeri enostavnejših in hitrejših metod za razlikovanje mikobakterij.

Metoda spoligotipizacije je v svojem začetku določala prisotnost ali odsotnost 43 unikatnih DNK nekodirajočih zaporedij, ki se nahajajo na 36 baznih parov dolgem zaporedju, na lokusu DR, mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* (Kamerbeek in sod., 1997). Zhang s sodelavci (2010) je osnovnim 43 oligonukleotidom dodal še dodatnih 25 in tako z 68 oligonukleotidi nekoliko povečal moč razlikovanja izolatov. Van der Zanden in sod. (2002) je njeno moč razlikovanja želel povečati v svoji raziskavi s 104 različnimi oligonukleotidi. V nasprotju z metodo RFLP, ki je dolgotrajna, zahtevna za izvedbo in zahteva veliko količino kakovostne DNK, je metoda spoligotipizacije hitra in enostavna, katere osnova je verižna reakcija pomnoževanja DNK s polimerazo (PCR). Na žalost je

njena moč razlikovanja, ne glede na število testiranih oligonukleotidov, med izolati mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis*, veliko nižja. Njena največja prednost so značilni spoligotipi, ki razlikujejo različne svetovne genetske družine in dobro razlikovanje izolatov *M. tuberculosis* z manj kot 5 kopijami IS6110 (Sola in sod., 1998; Van Soolingen in sod., 2001; Bauer in sod., 1999). Leta 2006 je bila na osnovi 39.295 izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* iz 122 držav sveta, osnovana baza spoligotipov, imenovana SpolDB4 in je še dandanes dostopna na spletu ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd\\_myco.html](http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html)) (Brudey in sod., 2006). V njej je opisanih 1939 spoligovzorcev, ki pripadajo genetskim družinam (vsaka genetska družina vsebuje najmanj dva spoligotipa) in 3370 spoligovzorcev, ki so unikatni in ne pripadajo nobeni genetski družini. Analiza svetovnih spoligotipov je pokazala 62 večjih genetskih linij, kot so naprimer: Centralno-Azijska (CAS, angl. Central-Asian), Vzhodno-Afriško-Indijska (EAI, angl. East-African-Indian), Haarlem (H, angl. Haarlem), Latinsko-Ameriška-Mediterska (LAM, angl. Latin-American-Mediterranean), linija Peking (angl. Beijing, Beijing like), linija S (največja pojavnost na Siciliji in Sardiniji), linija T (sodobni izolati tuberkuloze), linija X (družina z izolati, ki imajo majhno število kopij IS6110). Vsaka izmed njih je še natančneje opredeljena; naprimer linija CAS se deli v dve večji liniji CAS1-tip Delhi (Indija in Indijski subkontinent) in CAS1-Kilimanjaro (Tanzanija), EAI linija je razdeljena v 4 podlinije; EAI2-Nonthaburi, EAI6-Bangladesh/1, EAI7-Bangladesh/2 in EAI8-Madagascar (Brudey in sod., 2006).

Leta 2012 je izšla novejša različica spletnega orodja za ugotavljanje genetskih linij z nazivom SITVIT in spletnim dostopom ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)). Spletna aplikacija omogoča da uporabnik svoje izolate primerja z izolati spoligobaze in tako, na zelo enostaven način pridobi podatek v katero linijo svetovnih genetskih družin se uvrščajo njegovi izolati. Uporabniku je omogočeno tudi, da vnese v podatkovno bazo svoje izolate z vsemi ustreznimi podatki in tako prispeva k širjenju osnovne baze spoligovzorcev (Demay in sod., 2012).

*M. tuberculosis* je bila ena prvih bakterijskih vrst, pri katerih so bile na različnih lokusih prepoznane tandemske ponovitve. Poimenovane so bile kot variabilno število tandemskih ponovitev (angl. VNTR; Variable Number of Tandem Repeats). Prvi opisani VNTR lokusi so imeli različna poimenovanja, kot so npr. glavne polimorfne tandemske ponovitve (angl. MPTR; Major Polymorphic Tandem Repeat) in natančne tandemske ponovitve (angl. ETR;

Exact Tandem Repeat). Omenjeni ponovljivi elementi DNK so bili najdeni pri mikobakterijah iz sklopa *M. tuberculosis*, nekateri tudi pri drugih netuberkuloznih mikobakterijah (*M. goodii*, *M. kansasii* in *M. szulgai*) (Hermans in sod., 1992; Jagielski in sod., 2014). ETR enote so našli le pri mikobakterijah iz sklopa *M. tuberculosis*, njihove tandemske ponovitve pa so velikosti med 53 in 79 baznih parov (bp). S sekveniranjem so ugotovili, da so lokusi na katerih so ETR ponovitve, visoko variabilni, v nasprotju s tem pa je variabilen le en lokus z MPTR ponovitvijo. Izmed 11 različnih MPTR/ETR lokusov se jih je v začetku uporabljalo le 5 (ETR A-E). V primerjavi z metodo RFLP, je bila moč razlikovanja teh prvih lokusov veliko nižja. Ko je bil uspešno sekveniran genom *M. tuberculosis* H37Rv, so bili prepoznani tudi novi VNTR lokusi v skupini mikobakterijskih ponovljivih enot (angl. MIRU; Mycobacterial Interspersed Repetitive Units), ki jih je prvi opisal Supply in sod. (1997). Na genomu *M. tuberculosis* H37Rv je bilo prepoznanih 41 lokusov, ki so vsebovali tandemske ponovitve velikosti med 46 in 101 bp. V začetku so uporabljali le 12 lokusov, kjer je bila dokazana variabilnost tandemskih ponovitev in ti so se izkazali kot primerni za tipizacijo bakterij iz sklopa *M. tuberculosis* (Supply in sod., 2000; Mazars in sod., 2001; Savine in sod., 2002; Supply in sod., 2003; Sola in sod., 2003; Allix in sod., 2004). Med njimi sta bila dva lokusa, ki sta bila že predhodno opisana (ETR-D in ETR-E). Zaradi svoje enostavnosti, ponovljivosti in možne medlaboratorijske primerljivosti, se je metoda začela uporabljati po vsem svetu. Z 12 izbranimi lokusi še vedno ni omogočala zadostne ločljivosti izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*, zato je metoda RFLP ostajala kot metoda izbora tipizacije. Ko je metoda MIRU-VNTR v letu 2006 dosegla standardizacijo, se je njena uporabnost še povečala in število lokusov je naraslo na 24, v nekaterih analizah celo na 29 (Supply in sod., 2006; Allix-Beguec in sod., 2014). Svetovna baza podatkov MIRU-VNTR genotipov (MIRU-VNTRplus; <http://www.miru-vntrplus.org/>) je omogočala številne epidemiološke raziskave, kot tudi raziskave populacijske genetike, ki so pokazale, da ima metoda velik potencial, da postane metoda izbora tipizacije izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* (Weniger in sod., 2010; Hill in sod., 2012; Kremer in sod., 2005; Van Deutekom in sod., 2005; Allix in sod., 2006; Allix-Beguec in sod., 2008c; Allix-Beguec in sod., 2008a; Allix-Beguec in sod., 2008b; Sloot in sod., 2013). Optimizacija izbranih lokusov je pokazala, da metoda doseže največjo moč razlikovanja v 24 lokusih. V letu 2009 je bila metoda standardizirana tudi z diagnostičnim kompletom MIRU-VNTR Typing Kit (Genoscreen, Lille, Francija) in še istega leta je

metodo ECDC določil kot metodo izbora za tipizacijo večkratnoodpornih izolatov *M. tuberculosis* in s tem je metoda nadomestila do tedaj uveljavljeno metodo izbora RFLP. Raziskave so pokazale, da metoda MIRU-VNTR/24 doseže podobno moč razlikovanja med izolati iz sklopa *M. tuberculosis*, kot metoda RFLP (Alonso-Rodriguez in sod., 2008; Oelemann in sod., 2007).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Tipizacija iz bakterijskih kultur/bakterijskih izolatov

Za izvedbo analize in ovrednotenja vseh treh metod genotipizacije smo v retrospektivno raziskavo vključili vse izolate iz sklopa *M. tuberculosis*, ki smo jih v Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik pridobili v obdobju treh let. To so prvi izolati bacilov tuberkuloze pri novo odkritih bolnikih v Sloveniji, pri katerih je bila diagnoza tuberkuloze potrjena tudi z osamitvijo bacilov na gojišču. V raziskavo smo zajeli izolate bacilov tuberkuloze vseh bolnikov obolelih za tuberkulozo v obdobju od 1.1.2007 do 31.12.2009 in so prijavljeni v Registru za tuberkulozo Republike Slovenije. V tem obdobju je bilo v Registru za tuberkulozo prijavljenih 636 oseb obolelih za tuberkulozo. Od tega, pri 65 oseb (10,2 %) nismo uspeli končne diagnoze tuberkuloze potrditi z osamitvijo bacilov na gojišču. Dva izolata smo naknadno izločili iz končne analize zaradi nezmožnosti uspešne tipizacije z eno izmed treh izbranih metod (en izolat nismo uspeli tipizirati z metodo RFLP, drugega pa z metodo MIRU-VNTR/24).

V našo molekularno epidemiološko analizo smo tako vključili 576 izolatov bacilov tuberkuloze, ki so bili odvzeti pri 569 bolnikih s tuberkulozo, v obdobju omenjenih treh let. 427 (74,1 %) izolatov smo v izolirali v našem Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik, 105 (18,3 %) izolatov smo dobili na testiranje občutljivosti iz Laboratorija za mikobakterije Zavoda za zdravstveno vrstvo Maribor (danes Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano Maribor) in 44 (7,6 %) izolatov iz Mikrobiološkega laboratorija Bolnišnice Topolšica.

Od 576 izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*, sta bila 2 (0,3 %) izolata identificirana kot vrsta *M. caprae*, preostali izolati (574; 99,7 %) pripadajo vrsti *M. tuberculosis* v ožjem pomenu besede. Vsi izolati so bili predhodno identificirani v Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik, po standardnem protokolu za identifikacijo mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis*: mikroskopski preparat obarvan z metodo za barvanje po auraminu in Ziehl-

Neelsenu, morfološki izgled kolonij na trdnih gojiščih (LJ in ST) in v tekočih gojiščih (MGIT), molekularni test MTD (GenProbe Inc., San Diego, ZDA; danes Hologic, Inc., Bedford, USA) za določanje RNA bakterij iz sklopa *M. tuberculosis* neposredno iz kliničnih vzorcev ter molekularni test Accuprobe (GenProbe Inc.) ali test GenoType *M. tuberculosis* Complex (Hain Lifescience, Nehren, Nemčija) za dokončno identifikacijo bakterijske vrste iz bakterijske kulture.

### 3.1.2 Tipizacija iz kliničnih vzorcev

V prospektivno raziskavo genotipizacije bacilov tuberkuloze smo vključili 79 kliničnih, mikroskopsko pozitivnih vzorcev, odvzetih 26 bolnikom (diagnostika opravljena po ustaljenih postopkih za ugotavljanje prisotnosti mikobakterij v vzorcih).

Raziskava je potekala v obdobju od 1.10.2011 do 31.1.2013. V raziskavo smo vključili vse novoodkrite, z mikroskopskim pregledom vzorca pozitivne bolnike s tuberkulozo, pri katerih je bilo možno pridobiti izmeček v dovolj velikih količinah. Pri izbranih 26 bolnikih smo želeli ugotoviti možnost tipizacije iz prvih vzorcev in spremljati uspešnost tipizacije v povezavi s časom trajanja bolezni in zdravljenja, zato smo pri vseh, kjer je to dopuščal potek bolezni, preverjali izmečke v tedenskih intervalih do dne, ko je bil bolnik diagnosticiran kot mikroskopsko negativen. Pri nekaterih bolnikih ni bilo možno pridobiti več kot en vzorec. Vsi vzorci so bili izmečki.

Takoj po odkritju novega bolnika s tuberkulozo smo v dogovoru z vodjo Oddelka za tuberkulozo Klinike Golnik (Oddelek 700) prejeli nov vzorec, ki smo ga v celoti (5 do 20 ml) vključili v raziskavo. Vzorec je bil transportiran v Laboratorij za mikobakterije v eni uri po odvzemu. V nekaterih primerih smo zaradi zdravstvenega stanja bolnika (poslabšanje bolezni, nezmožnost oddaje izmečka, nekakovosten izmeček-slina, količina manjša kot 3 ml) prvi vzorec prejeli kasneje kot v enem dnevu od odkritja bolezni (1 do 15 dni) (Preglednica 2).



Preglednica 2: Seznam vzorcev za tipizacijo z metodo MIRU-VNTR/24 iz kliničnih vzorcev, mikroskopska pozitivnost vzorcev in uspešnost tipizacije.

Table 2: List of samples for MIRU-VNTR/24 typing from clinical specimens, microscopic positivity of samples and success of typing.

Oznaka pacienta	Tipizacija uspešna (število vzorcev)	Tipizacija ni uspešna (število vzorcev)	Mikroskopija (mikroskopska pozitivnost prvih vzorcev)	Čas do pozitivne kulture - tekoče gojišče MGIT (dni)
OKA	0	2	1ARB	6
ČIV	1	1	2ARB	7
KVI	1	1	2ARB	5
RKA	0	1	2ARB	10
HKA	0	1	1+	9
LFR	0	1	1+	5
MRU	2	0	1+	7
RFR	3	5	1+	7
SJE	1	0	1+	6
BHA	4	6	2+	7
BMA	1	0	2+	6
DMA	0	1	2+	8
HMI	1	6	2+	7
HHA	0	7	2+	9
JMI	1	0	2+	6
KKL	0	1	2+	5
KSA	10	1	2+	6
LMU	2	2	2+	2
BFI	2	2	3+	5
GAL	1	0	3+	4
HDA	1	0	3+	5
IAS	2	3	3+	3
KMA	1	0	3+	20
MMI	1	1	3+	6
MRA	1	0	3+	5
TVI	0	1	3+	6

Legenda: 1ARB (3-6 bacilov / 100 vidnih polj), 2ARB (7-9 bacilov / 100 vidnih polj), 1+ (10-99 bacilov / 100 vidnih polj), 2+ (1-10 bacilov / vidno polje) in 3+ (>10 bacilov / vidno polje).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izolacija genomske DNK

Laboratorij za mikobakterije Klinike Golnik ima bogato zbirko izolatov genomske DNK bacilov iz sklopa *M. tuberculosis* vseh bolnikov obolelih za tuberkulozo, pri katerih so bili bacili osamljeni na gojiščih od leta 1999, ter pri vseh bolnikih obolelih za večkratnoodporno obliko tuberkuloze od leta 1995. V zbirki je več kot 4000 izolatov, pri katerih je bila izolacija genomske DNK opravljena po priporočenem postopku za metodo RFLP. To metodo je v letu 1999 v Sloveniji uvedla Žolnir-Dovč M. (Žolnir-Dovč in sod., 2003), kot metodo izbora tipizacije mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis*. Priporočila avtorjev te metode so bila glavno vodilo za izvedbo metode, zato je vsa genomska DNK pridobljena po enakem postopku (Van Soolingen in sod., 1994; Van Embden in sod., 1993, Van Soolingen in sod., 2002). V primerjavi z ostalimi sodobnejšimi metodami tipizacije, metoda RFLP zahteva veliko količino kakovostne DNK. V namen ohranjanja in izvajanja čim večjega števila tipizacijskih metod tudi v prihodnosti, v Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik ohranjamo prvotno obliko izolacije genomske DNK (Van Soolingen in sod., 2002).

Za kakovostno izolacijo genomske DNK smo v 400  $\mu$ l pufra TE (zmes 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) in 10 mM EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA), razredčena z destilirano vodo v razmerju 1:10) smo dodali eno do dve zanki bakterij iz trdnega gojišča Löwenstein-Jensen (LJ). Bakterijsko kulturo v pufri smo dobro premešali in segrevali 20 minut pri 80 °C. S tem smo povzročili razpad celic in uničili bacile tuberkuloze. Po končanem segrevanju smo epruvete z vzorci ohladili na sobno temperaturo in kratko centrifugirali (spin-down), da preprečimo razpršitev aerosola pri nadaljnem delu. V zaščitni mikrobiološki komori smo dodali 50  $\mu$ l encima lizocim (Sigma-Aldrich, 10 mg/ml), ki razgradi celično steno. Mešanico smo dobro premešali na mešalniku (vortex) 10 sek. Mešanico smo inkubirali s stresanjem (45 stresljajev na min) v vodni kopeli vsaj eno uro oziroma preko noči (preko noči se priporoča predvsem za vrste *M. bovis* in *M. microti*) pri 37 °C.

V naslednji stopnji smo epruvete ohladili na sobno temperaturo in v zaščitni mikrobiološki komori dodali 75 µl mešanice 10 % raztopine SDS in encima proteinaze K. Mešanico smo pripravili tik pred uporabo in sicer tako, da smo za vsak vzorec vzeli 5 µl proteinaze K (Sigma-Aldrich) s koncentracijo 10 mg/ml in 70 µl 10 % SDS (Sigma-Aldrich). 10 mg SDS smo raztopili v 100 ml destilirane vode. Po kratkem mešanju smo mešanico inkubirali 10 min na 65 °C.

Raztopino CTAB/NaCl smo postavili v vodno kopel, da se segreje na 65 °C. Za pripravo 100 ml raztopine CTAB/NaCl smo raztopili 4,1 g NaCl (Sigma-Aldrich) v 80 ml sterilne vode. Med mešanjem smo dodali 10 g CTAB (N-cetyl-N,N,N,- trimethyl amonium bromide) (Sigma-Aldrich) in segrevali na 65 °C, da se raztopi. Nato smo dodali do 100 ml sterilne vode. Vzorce smo ponovno kratko centrifugirali in v zaščitni mikrobiološki komori v vsako epruveto dodali 100 µl raztopine 5M NaCl in 100 µl raztopine CTAB/NaCl. Raztopino 5M NaCl smo pripravili tako, da smo 29,2 g NaCl (Sigma-Aldrich) raztopili v 100 ml destilirane vode in raztopino avtoklavirali 20 min pri 121 °C. Vsak vzorec smo mešali na mešalu toliko časa (30 sekund), da je postal mlečne barve in jih nato inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C, 10 min.

Po 10 minutah smo vzorce kratko centrifugirali in v vsak vzorec v zaščitni mikrobiološki komori dodali 750 µl raztopine kloroform/izoamil alkohola v razmerju 24:1 (Sigma-Aldrich). Mešanico smo dobro premešali na namiznem mešalu (vortex), vsaj 10 sekund in centrifugirali 8 min pri 12000 x g pri 25 °C (centrifuga 5417R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija). V epruveti sta se pojavili dve fazi, spodnja, kjer so bili beljakovinski in polisaharidni ostanki celic in zgornja, kjer so se nahajale nukleinske kisline. Zgornjo fazo, ki je vsebovala mikobakterijske nukleinske kisline, smo prenesli v novo epruveto in ji dodali 0,6 volumna izopropanola (Sigma-Aldrich), ki obori DNK iz vodne faze (600 µl DNK smo dodali 360 µl izopropanola). Vzorce smo za 30 min postavili v zmrzovalnik na – 20 °C. Po 30 minutah smo vzorce centrifugirali 15 min, pri 12000 x g, pri sobni temperaturi. V zaščitni mikrobiološki komori smo odstranili večino supernatanta tako, da je v epruveh ostal le sediment in približno 20 µl supernatanta. Na vsak sediment smo dodali po 1 ml 70 % etanola, ki smo ga pripravili z mešanjem absolutnega etanola (Sigma-Aldrich) in sterilne vode (70 ml absolutnega alkohola in 30 ml sterilne vode). Pred uporabo

mora biti mešanica (70 % etanol) ohlajena na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Epruvete smo nekajkrat obrnili na glavo, da smo dobro sprali oborino DNK. Vzorce smo centrifugirali 5 min pri sobni temperaturi, pri 12000 x g in odstranili ves supernatant. Epruvete smo pustili nekaj časa odprte, da je izhlapel ves etanol. Na sediment oziroma izolirano DNK smo dodali od 20  $\mu\text{l}$  do 40  $\mu\text{l}$  pufra TE. Vzorce z izolirano DNK smo inkubirali eno uro s stresanjem pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in jih pustili čez noč na stresalni plošči (Biometra, Göttingen, Nemčija) na sobni temperaturi. Tako pripravljene izolate mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* smo do uporabe hranili v hladilniku na  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Bakterijsko DNK izolirano po zgornjem protokolu smo uporabili za tipizacijsko metodo RFLP. Za tipizacijski metodi MIRU-VNTR/24 in metodo spoligotipizacije smo zgoraj izolirano DNK redčili s pufrom TE v razmerju 1:100.

### **3.2.2 Metoda RFLP**

#### **3.2.2.1 Določanje koncentracije izolirane DNK**

Za določanje koncentracije izolirane DNK smo uporabili metodo barvanja z etidijevim bromidom. Raztopino etidijevega bromida smo pripravili tako, da smo 100 mg etidijevega bromida (Sigma-Aldrich) raztopili v 10 ml destilirane vode, tako, da smo dobili raztopino 10 mg/ml. 3 ml pripravljene raztopine etidijevega bromida (10 mg/ml) smo dodali 57 ml destilirane vode, in dobili raztopino s koncentracijo 500  $\mu\text{g/ml}$ . Delovno raztopino (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) smo dobili tako, da smo osnovno raztopino etidijevega bromida 500  $\mu\text{g/ml}$  redčili s pufrom Tris-Borate-EDTA (TBE; Sigma-Aldrich) v razmerju 1:1000. V 80 ml raztopine agaroze MP s pufrom TBE, smo dodali 80  $\mu\text{l}$  raztopine etidijevega bromida. Pri omenjenem barvanju za določevanje koncentracije nukleinskih kislin ugotavljamo intenziteto fluoresciranja etidijevega bromida, ki je odvisna od količine izolirane DNK. Pripravili smo agarozni gel, 0,8 % raztopino agaroze v pufri TBE in sicer smo 0,64 g agaroze MP (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) raztopili v 80 ml pufra TBE (Sigma-Aldrich), ki smo ga redčili v razmerju 1:10 (100 ml pufra 10xTBE in 900 ml destilirane vode). Raztopino smo ohladili

(+70 °C), dodali 0,5 µg/ml etidijevega bromida (80 µl) in nalili v model za gel. Ko se je gel strdil, smo ga prenesli v kadičko za elektroforezo.

Izolirano DNK smo na namiznem mešalu premešali in kratko centrifugirali (spin down). V 9 µl pufra 1xDNA (pripravili smo ga tako, da smo 50 g glicerola (Sigma-Aldrich), 0,05 g bromfenol modrila (Sigma-Aldrich) in 0,1861 g EDTA (Sigma-Aldrich) prelili s 5 ml 1M Tris/HCl (pH 7,5) in dopolnili do 100 ml s sterilno vodo. 1M Tris/HCl (pH 7,5) smo pripravili tako, da smo 12,11 g TRISMA BASE raztopili v 100 ml sterilne vode, prav tako smo 15,76 g TRISMA HCl raztopili v 100 ml sterilne vode in zmešali 3,86 ml TRIS BASE in 16,1 ml TRIS HCl. Tako pripravljen pufer 5 x DNK smo redčili z destilirano vodo v razmerju 1:5 (100 µl pufra 5 x DNK in 400 µl sterilne vode (Sigma-Aldrich)) smo dodali 1 µl izolirane DNK premešali s pipeto in po 10 µl vzorca prenesli v jamice na agaroznem gelu. Kadičko za elektroforezo smo pokrili s pokrovom in jo priključili na električno napetost (100 V, 15 min). Po končani elektroforezi, smo sliko gela prenesli v aparat GelDoc 2000 (Bio-Rad, Hercules, ZDA) s pomočjo kamere. To sliko smo primerjali s sliko v navodilih za izvedbo metode RFLP (van Soolingen in sod., 2002) in s primerjavo fluorescence ocenili koncentracijo DNK.

#### 3.2.2.2 Razgradnja DNK

Razgradnjo DNK smo izvedli z restrikcijskim encimom *PvuII* koncentracije 10 U/µl, (Promega, Madison, ZDA). V cepitev smo poleg 16 kliničnih izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* vedno vključili tudi DNK, izolirano iz primerjalnih (referenčnih) izolatov (*M. tuberculosis* MT 14323), ki nam omogoča mednarodno primerljivost rezultatov metode RFLP. Za vsak vzorec smo pripravili zmes 16 µl sterilne vode (Sigma-Aldrich), 2 µl 10x pufra za restrikcijo, 1 µl restrikcijskega encima *PvuII* (Promega) in 1 µl izolirane genomske DNK (4,5 µg). Raztopino smo premešali z namiznim mešalom, kratko centrifugirali in inkubirali 1 uro na 37 °C. Po končani inkubaciji oziroma razgradnji smo v vsako epruveto dodali po 5 µl nanašalnega pufra 5 x DNA (postopek priprave smo že opisali v poglavju o določanju koncentracije DNK, poglavje 3.2.2.1 Določanje koncentracije izolirane DNK).

### 3.2.2.3 Ocena koncentracije DNK po razgradnji

Za kontrolo razgradnje in hitro oceno koncentracije razgrajene DNK smo izvedli elektroforezo na podoben način kot je potekala določitev koncentracije izolirane DNK. V vsako jamico smo dodali 5  $\mu$ l razgrajenega vzorca in izvedli elektroforezo pri 100 V, 25 min. Po končani elektroforezi smo sliko gela prenesli v aparat GelDoc 2000 (Bio-Rad) s pomočjo kamere. To sliko smo primerjali s sliko v navodilih (Van Soolingen in sod., 2002) in s primerjalno ocenili koncentracijo DNK po razgradnji. Na osnovi tega podatka smo določili volumen DNK, ki je potreben za »Southern blot« (približno 2  $\mu$ g razgrajene DNK v vsaki jamici).

### 3.2.2.4 Ločevanje fragmentov z elektroforezo

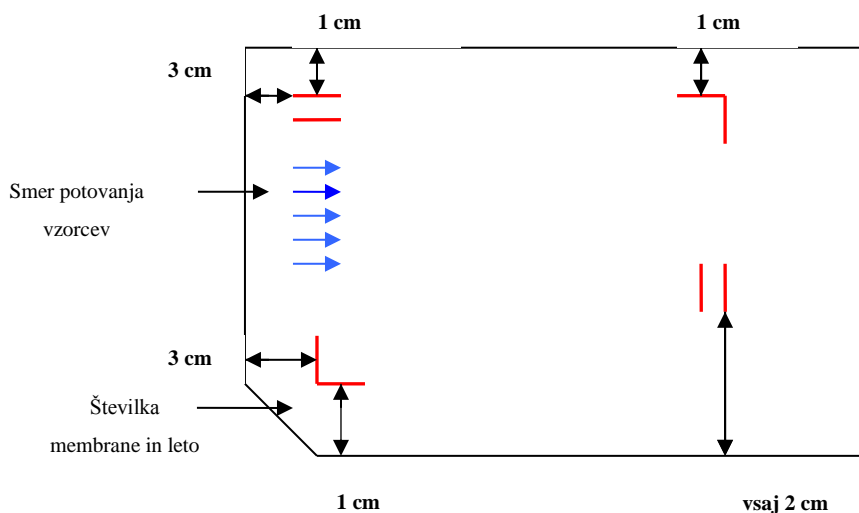
Elektroforeza je metoda, ki omogoča ločevanje fragmentov DNK različnih velikosti v agaroznem gelu. V naši raziskavi smo fragmente DNK ločili z elektroforezo preko noči. Pripravili smo 0,8 % raztopino agaroze (Roche Diagnostics) v pufru TBE (Sigma-Aldrich), ki je 10 x koncentriran, zato smo ga redčili v razmerju 1:10 in tako oblikovali agarozni gel dimenzije 25 x 15 cm. V jamice smo dodali ustrezno količino razgrajene DNK. V prvo jamico smo dodali označevalec elektroforeze, to je 20  $\mu$ l mešanice označevalca lambda-*Hind*III (Sigma-Aldrich) in PhiX174-*Hae*III (Sigma-Aldrich). Z njegovo pomočjo smo lahko sledili poteku elektroforeze in spremljali hitrost potovanja delcev DNK. Priporočljivo je, da je dolžina prepotovanega označevalca elektroforeze vsakokrat enaka, saj s tem lahko zagotovimo primerljivost rezultatov med različnimi vzorci. Elektroforezo smo prekinili, ko je označevalec prepotoval 7,0 cm od začetnega nanosa vzorca (možnost napake  $\pm$  0,3 cm). Označevalec elektroforeze smo pripravili tako, da smo pomešali 16  $\mu$ l označevalca lambda-*Hind*III koncentracije 40 ng/ $\mu$ l (Sigma-Aldrich), 40  $\mu$ l označevalca PhiX174-*Hae*III koncentracije 50 ng/ $\mu$ l (Sigma-Aldrich), 104  $\mu$ l pufru TE in 40  $\mu$ l pufru 5 x DNK. V drugo, 11. in 19. jamico smo nanegli DNK primerjalnega izolata MT 14323. V preostale jamice smo nanegli ustrezno količino razgrajene DNK pridobljene iz kliničnih vzorcev.

Na začetku je elektroforeza potekala pri 100 V, 10 min, nato pa preko noči pri stalni napetosti 36 V (16-18h). S pomočjo sistema GelDoc 2000 (Bio-Rad) smo preverili, kako daleč je prepotoval označevalec v prvi jamici. Na osnovi izmerjene razdalje smo izračunali, koliko časa mora elektroforeza še potekati, da bo označevalec dosegel želeno dolžino 7,0 cm.

### 3.2.2.5 Prenos fragmentov DNK iz agaroznega gela na membrano (»Southern blot«)

Po končani EF smo gel za 5 do 15 min izpostavili UV svetlobi. Gel smo prenesli v kadičko in ga spirali 10 min s 0,25 M HCl (Merck, Darmstadt, Nemčija). Sledilo je kratko spiranje s sterilno vodo nato 20 minutno spiranje v 0,4 M NaOH (Merck). Sledilo je ponovno kratko spiranje s sterilno vodo, in 20 minutno spiranje s 0,4 M NaOH (Merck). Na koncu smo gel ponovno splaknili z destilirano vodo. S tem smo omogočili učinkovitejši prenos DNK iz gela na membrano.

Pred začetkom prenosa smo ustrezno označili membrano, zaradi lažje analize dobljenih podatkov (po protokolu Laboratorija za mikobakterije Klinike Golnik, SOP-303-MD-DN-112, Slika 7).



Slika 7: Označevanje membrane za Southern Blot pri metodi RFLP.  
 Figure 7: Marking membrane for Southern Blot in RFLP method.

Prenos fragmentov DNK smo izvedli z aparatom za vakumski prenos (Biometra). Na porozno ploščo smo položili navlažen filtrirni papir (15 x 20 cm), nanj smo položili

nitrocelulozno membrano Hybond N+ (Amersham Bioscience, Bucks, Velika Britanija), na membrano pa gel. Aparat za prenos smo priključili na vakumsko črpalko in gel prekrili s pufrom 10 x SSPE (pufer naj sega približno 1 cm nad gel). Pufer 10 x SSPE smo pripravili tako, da smo 17,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck), 105,12 g NaCl (Merck) in 3,7g EDTA (Sigma-Aldrich) raztopili v sterilni vodi s segrevanjem na magnetnem mešalu in dopolnili s sterilno vodo v merilni bučki do 1l. Tako pripravljeni raztopini smo umerili pH, ki mora biti 7,4 in na koncu raztopino avtoklavirali 30 min pri 121 °C. Prvih pet minut je pivnanje potekalo pri 100 kPa, nato pa približno 30 min pri 180 kPa. Ko se je gel vidno stanjšal, smo pivnanje prekinili in membrano položili za 2 min na filter papir, ki smo ga prej namočili z raztopino 0,4 M NaOH (Merck). Nato smo membrano sprali z raztopino pufera 5 x SSC (100 ml 20 x SSC in 300 ml sterile vode). Pufer SSC (20 x) smo pripravili tako, da smo 175,3 g NaCl (Merck) in 88,2 g Na-citrat (Merck) raztopili v sterilni vodi v merilni bučki in dolili vodo do 1 l. Tako pripravljeni raztopini smo umerili pH (pH = 7,4) in raztopino avtoklavirali 30 min pri 121 °C. Tako pripravljeno membrano smo lahko takoj uporabili za hibridizacijo ali pa smo jo shranili v hladilnik do nadaljnje uporabe.

### 3.2.2.6 Priprava sonde DNK za hibridizacijo

#### POMNOŽEVANJE DNK SONDE Z METODO VERIŽNE REAKCIJE POMNOŽEVANJA DNK S POLIMERAZO »PCR«

Za sintezo sonde DNK, ki smo jo potrebovali za hibridizacijo fragmentov DNK na membrani smo pomešali 50 µl mešanice PCR Master iz diagnostičnega kompleta PCR Master Mix (Roche Diagnostics), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Waltham, ZDA), 2 µl začetnega oligonukleotida INS 1 (koncentracija 50 ng/µl), 2 µl začetnega oligonukleotida INS 2 (koncentracija 50 ng/µl) in 39 µl vode iz diagnostičnega kompleta »PCR Master« (Preglednica 3). Mešanici smo v zaščitni mikrobiološki komori dodali 5 µl DNK izolirane iz izolata *M. bovis* BCG. Vzorce smo vstavili v aparat za pomnoževanje nukleinskih kislin (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, Waltham, ZDA).

Pred začetkom prvega cikla pomnoževanja smo reakcijsko mešanico inkubirali 90 sekund pri 96 °C. Pomnoževanje je potekalo s 35-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR



(angl. *polymerase chain reaction*), sestavljenega iz treh inkubacij: 20 s pri 96 °C, 20 s pri 65 °C in 40 s pri 72 °C. Na koncu je sledila dve minutna inkubacija na 72 °C. Po končanem pomnoževanju smo z elektroforezo preverili ali je bila reakcija uspešna.

Preglednica 3: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov INS 1 in INS 2, ki smo jih uporabili za tipizacijo z metodo RFLP.

Table 3: Primers used for typing with RFLP method. Primers INS 1 and INS 2.

Oligonukleotidni začetniki	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov
INS 1	5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3'
INS 2	5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3'

### ČIŠČENJE SONDE

Za čiščenje sonde (namnoženega pridelka) smo uporabili diagnostični komplet za čiščenje PCR pridelkov (QIAquick, PCR Purification kit; Qiagen, Hilden, Nemčija) in postopali po navodilu proizvajalca. V zaščitni mikrobiološki komori smo sondi dodali petkratno količino pufru PB (za 100 µl produkta smo dodali 500 µl pufru PB). Mešanico smo prenesli v čistilne kolone s filtri in vse skupaj centrifugirali 60 sekund pri največji hitrosti. Sonda se je med postopkom vezala na kolono s filtrom. Sondo smo sprali s 750 µl pufru PE. Ponovno smo centrifugirali 60 sekund pri največji hitrosti, supernatant smo zavrgli, kolono s filtrom pa smo prenesli v čisto epruveto, kjer smo s 50 µl pufru EB sprostil DNK iz filtra. Tako očiščeni DNK sondi smo z elektroforezo v 0,8 % agaroznem gelu (Roche Diagnostics) določili koncentracijo in glede na to izbrali ustrezen volumen sonde za hibridizacijo.

### OZNAČEVANJE SONDE

Za hibridizacijo, detekcijo in označevanje sonde smo uporabili diagnostični komplet reagentov ECL (Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System, Amersham Bioscience), ki uporablja encim hrenovo peroksidazo za označevanje sonde. Označena sonda se veže na specifična mesta v insercijskem zaporedju IS6110. Ustrezno količino

sonde (20  $\mu$ l), ki smo jo razredčili do koncentracije 10 ng/ $\mu$ l, smo segrevali 5 minut pri 99,9 °C in jo nato na hitro ohladili (do 5 minut na ledu). Dodali smo ji 20  $\mu$ l reagenta za označevanje iz diagnostičnega kompleta in enak volumen glutaraldehida. Zmes smo kratko centrifugirali in inkubirali 10 minut v vodni kopeli pri 37 °C. Tako označena sonda je bila primerna za hibridizacijo.

#### 3.2.2.7 Hibridizacija

Po navodilu proizvajalca smo membrano inkubirali v hibridizacijskem pufru v hibridizacijski pečici, 15 minut pri 42 °C. Nato smo v hibridizacijski pufer dodali označeno sondo. Hibridizacija je potekala v hibridizacijski pečici preko noči, pri temperaturi 42 °C z rahlim tresenjem.

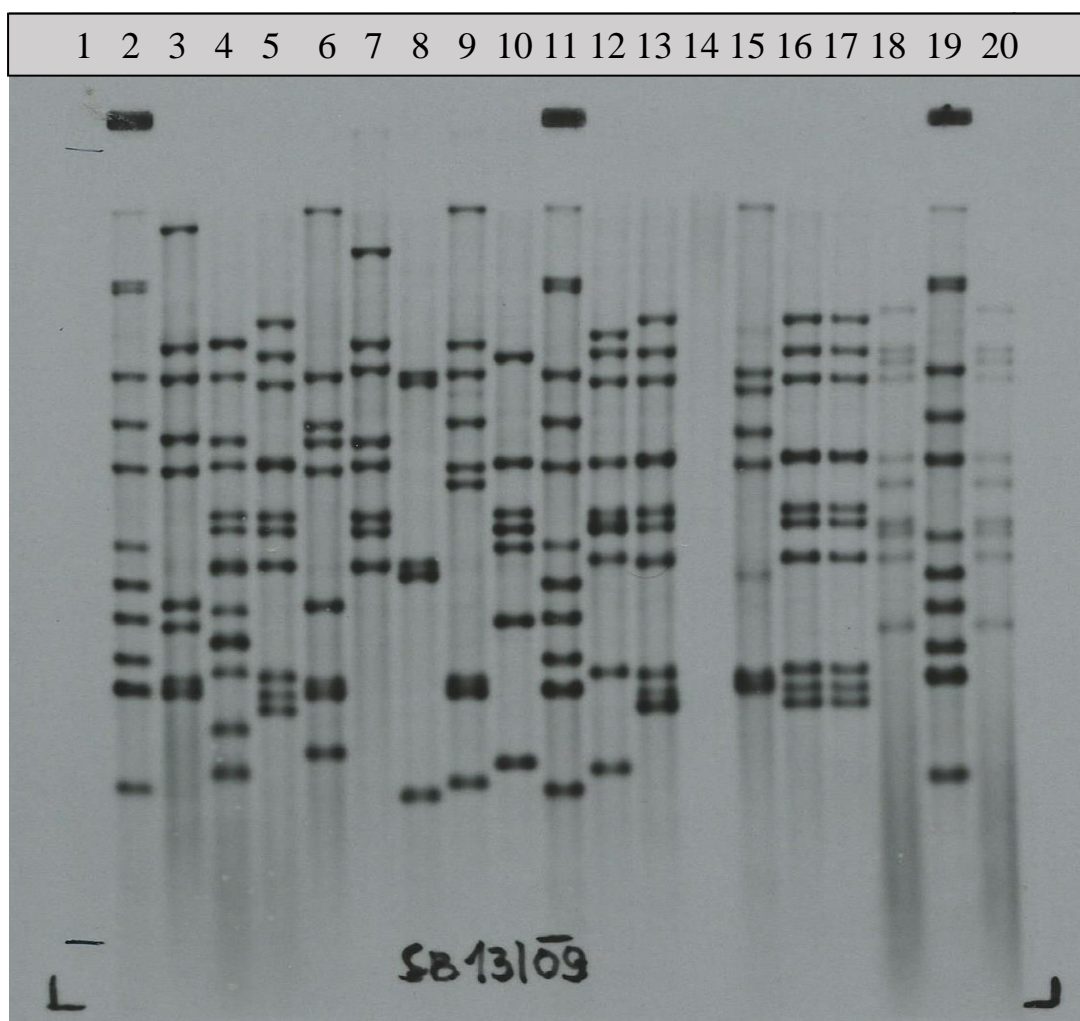
#### 3.2.2.8 Spiranje membrane po hibridizaciji

Pufer za spiranje membrane smo v vodni kopeli segreli na 42 °C. Preko membrane smo nalili 200 ml pufra za spiranje in membrano spirali v hibridizacijski pečici 20 min, pri 42 °C. Postopek smo dvakrat ponovili. Po spiranju smo membrano prenesli v novo kadičko, kjer smo jo dvakrat po pet minut spirali še v pufru 2 x SSC (50 ml 20x SSC in 450ml sterilne vode). Priprava pufra SSC je opisana v poglavju 3.2.2.5 Prenos fragmentov DNK iz agaroznega gela na membrano.

#### 3.2.2.9 Detekcija

Detekcija nastalih hibridov je potekala v temnici pri infrardeči svetlobi z uporabo reagentov iz diagnostičnega kompleta ECL. Po spiranju, smo membrano položili na filter papir, da se je posušila. V temnici smo v 50 ml čašo pripravili mešanico detekcijskega reagenta iz 10 ml detekcijskega reagenta 1 in 10 ml detekcijskega reagenta 2, ki morata biti pred uporabo segreta na sobno temperaturo. Mešanico smo prelili v kadičko. Membrano smo prestavili v kadičko in z rahlim mešanjem pustili v kadički 1 min. Nato smo jo položili na filter papir in osušili z filter papirjem. Posušeno membrano smo zavili v folijo za živila in položili v rentgensko kaseto za razvijanje filma in nanjo položili film za

razvijanje (18 x 24 cm, Sigma-Aldrich). Kaseto smo zaprli in pustili 1 minuto. Po eni minuti smo membrano vzeli ven iz kasete in film razvili v stroju za razvijanje rentgenskih slik (Aparat za razvijanje filmov Dürr Dental, Dürr Dental GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen, Nemčija). Glede na intenziteto pasov smo izpostavljenost novega filma ustrezno prilagodili, da smo dobili čim boljšo vidnost posameznih pasov. Primer rezultata metode RFLP je prikazan na Sliki 8.



Slika 8: Primer rezultata metode RFLP. Na mestu 2, 11 in 19 je RFLP vzorec DNK izolirane iz primerjalnih (referenčnih) izolatov (*M. tuberculosis* MT 14323). Na mestu 3-10, 12-18 in 20 je RFLP vzorec dobljen iz kliničnih izolatov (Laboratorij za mikobakterije Golnik).

Figure 8: Example of result of RFLP method. Lane 2, 11 and 19 are reference strains (*M. tuberculosis* MT 14323). Lane 3-10, 12-18 in 20 are RFLP pattern from clinical isolates (Laboratory for Mycobacteria Golnik).

### 3.2.2.10 Računalniška obdelava podatkov

Podatke na filmu smo pretvorili v digitalno obliko s pomočjo denzitometra (Imaging Densitometer 710, Bio-Rad). Slike smo obdelali z računalniškim programom GelCompar verzija 3.0 in njegovo sodobnejšo različico program Bionumerics verzija 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija). Ta program omogoča medsebojno primerjavo genotipov analiziranih izolatov, pred tem, pa je zelo pomembna predhodna standardizacija gelov. Obdelava podatkov s programom Bionumerics je potekala v štirih fazah. V prvi in drugi smo označili vzorce in določili območje zajemanja podatkov. V tretji fazi smo definirali primerjalne izolate MT 14323, ter razporeditev in lego pasov posameznega primerjalnega izolata. Lego vseh teh pasov smo normalizirali z lego izhodiščnega primerjalnega izolata. Zato ima ta stopnja tudi naziv, stopnja normalizacije. V zadnji stopnji smo določili lego vseh pasov kliničnih izolatov. Tako obdelane podatke smo shranili v bazo podatkov in na podlagi te izdelali dendrogram skladnosti med psameznimi izolati. Pri tem smo uporabili algoritem UPGMA, s koeficientom podobnosti Dice in z 1,0 odstotno toleranco zamika med pasovi.

### 3.2.3 Metoda spoligotipizacije

Metoda spoligotipizacije temelji na metodi verižne reakcije pomnoževanja DNK s polimerazo. Po svoji naravi je enostavna, hitra in ponovljiva. Ugotavlja polimorfizem na specifičnem delu kromosomalnega lokusa imenovanega »mesto DR« (angl. Direct Repeat region, DR) (Slika 9). Rezultat metode je prisotnost oziroma odsotnost 43 specifičnih zaporedij DNK v obliki zaporedja pik (pozitivna hibridizacija) in praznih prostorov (negativna hibridizacija). Nadomestna oblika zapisa rezultata je oktalna koda oziroma mednarodno ime, to je številka določena z mednarodno bazo spoligovzorcev SpolDB4 (Brudey in sod., 2006).

### 3.2.3.1 Pomnoževanje DNK

Potrebujemo zelo majhno količino izolirane DNK. Zadostuje že 10 ng/ $\mu$ l izolirane mikobakterijske DNK, zato smo genomsko DNK, izolirano kot je opisano v poglavju 3.2.1 Izolacija genomske DNK, redčili v razmerju 1:100.

Metodo smo izvedli po navodilu proizvajalca, ki je priložen diagnostičnemu kompletu spoligotipizacije (Spoligotyping Kit, Isogen Bioscience B.V., Maarssen, Nizozemska). Pomnoževanje segmentov DNK smo izvedli v aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Perkin Elmer).

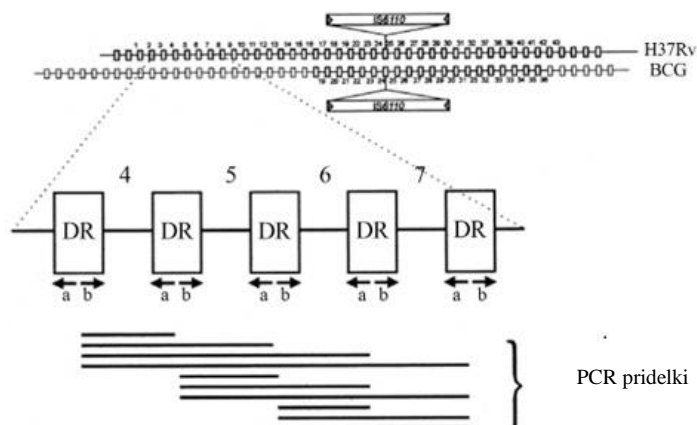
V reakcijsko mešanico za pomnoževanje DNK enega vzorca smo pomešali 5  $\mu$ l pufru 10 x SuperTaq (Qiagen), 4  $\mu$ l mešanice nukleotidov (dNTP, končna koncentracije 0,2 mM/vsak nukleotid), 4  $\mu$ l začetnega oligonukleotida DRa (Isogen Bioscience B.V), 4  $\mu$ l začetnega oligonukleotida DRb (Isogen Bioscience B.V) in 31  $\mu$ l molekularne vode (Sigma-Aldrich) (Preglednica 4). Na koncu smo dodali še 0,1  $\mu$ l encima polimeraze SuperTaq (Qiagen). Za vsak vzorec smo imeli 48  $\mu$ l reakcijske mešanice, ki smo ji v zaščitni mikrobiološki komori dodali 2  $\mu$ l izolirane genomske DNK.

V diagnostičnem kompletu so tudi pozitivne kontrole (*M. tuberculosis* izolat H37Rv in *M.bovis* BCG P3), katerih DNK pomnožujemo skupaj z ostalimi kliničnimi vzorci in jih nadalje v procesu spoligotipizacije vključimo med klinične vzorce pri hibridizaciji. Poleg pozitivnih kontrol uporabimo pri namnoževanju DNK tudi negativne kontrole (voda), ki so pokazatelj uspešnosti in kakovosti namnoževanja DNK (kontaminacija PCR pridelkov).

Preglednica 4: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov DRa in DRb, ki smo jih uporabili za tipizacijo z metodo spoligotipizacije.

Table 4: Primers used for spoligotyping. Primers DRa and DRb.

Oligonukleotidni začetniki	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov
DRa	5'- GGTTTTGGGTCTGACGAC - 3'
DRb	5'- CCGAGAGGGGACGGAAAC -3'



Slika 9: Princip metode spoligotipizacije. H37Rv in BCG sta izolata, ki služita kot pozitivna kontrola (*M. tuberculosis* izolat H37Rv in *M. bovis* BCG). DR je specifičen del kromosomalnega lokusa imenovan »Direct Repeat region«.

Figure 9: Principle of the spoligotyping method. H37Rv and BCG are positive control strains (*M. tuberculosis* strain H37Rv in *M. bovis* BCG). Direct repeat region (DR) on specific chromosomal locus.

Pred začetkom prvega cikla pomnoževanja smo reakcijsko mešanico inkubirali 3 minute pri 96 °C. Pomnoževanje je potekalo s 20-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR sestavljenega iz treh inkubacij: 1 min pri 96 °C, 1 min pri 55 °C in 30 s pri 72 °C. Na koncu je sledila pet minutna inkubacija na 72 °C. Po končanem pomnoževanju smo z elektroforezo preverili ali je bila reakcija uspešna.

### 3.2.3.2 Hibridizacija



Slika 10: Minibloter in nanašanje vzorcev za metodo spoligotipizacije

Figure 10: Spoligotyping method. Minibloter and adding samples on the membrane.

Membrana na kateri so nanešeni spoligo oligonukleotidi je kvadratne oblike, zato smo jo pred začetkom prve uporabe ustrezno označili in s tem pokazali njeno pravilno usmerjenost. Membrano je možno uporabiti večkrat. Proizvajalec zagotavlja do 10-kratno uporabo posamezne membrane.

V 150 µl pufru 2 x SSPE / 0,1 % SDS, sobne T smo v zaščitni mikrobiološki komori dodali 20 µl vzorca (PCR pridelka). Pufer 2 x SSPE / 0,1 % SDS smo pripravili tako, da smo pufer 20 x SSPE redčili z destilirane vode in 10 % SDS (100 ml 20 x SSPE, 890 ml destilirane vode in 10 ml 10 % SDS). Osnovno raztopino pufru SSPE 20x smo pripravili tako, da smo 35,6 g 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 210,24 g 3,6 M NaCl in 7,4 g 20 mM EDTA raztopili v destilirani vodi in dolili vodo do 1 l. Nato smo raztopino avtoklavirali in ji umerili pH na 7,4. Deset odstotno raztopino SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, BDH Laboratory Supplies, Leuven, Belgija) smo pripravili tako, da smo 10 g SDS raztopili v 100 ml destilirane vode. Mešanico smo na kratko premešali z namiznim mešalom in segrevali v vodni kopeli pri 99 °C, 10 min. Po segrevanju smo vzorce na hitro ohladili (na ledu) in kratko centrifugirali. Pufer 2 x SSPE / 0,1 % SDS smo v vodni kopeli segreli na 60 °C in v njem, v hibridizacijski pečici, 5 minut spirali membrano.

Med tem smo pripravili minibloter (Miniblotter MN45, Isogen Bioscience B.V.) (Slika 10). Na spodnji del minibloterja smo najprej dali podporno blazinico (Foam cushions PC 200, Isogen Bioscience B.V.). Po spiranju smo membrano položili na podporno blazinico in pokrili z zgornjim delom minibloterja. V jamice minibloterja smo nanesli pripravljene vzorce (Slika 10). Linije v kateri je nanešen vzorec potekajo pravokotno na linije v katerih so nanešeni spoligo oligonukleotidi na membrani. Hkrati je lahko nanešenih 45 vzorcev med katerimi so se nahajale naključno nanešene pozitivne in negativne kontrole. Vsaka serija vzorcev je vsebovala dve pozitivni kontroli (*M. tuberculosis* izolat H37Rv in *M. bovis* BCG P3) in 5-7 negativnih kontrol (voda) (Slika 11). Minibloter smo postavili v vodoravni legi v hibridizacijsko pečico. Hibridizacija je potekala 60 min, pri 60 °C, brez stresanja. Po eni uri smo minibloter prestavili na sobno temperaturo. Vzorce smo odstranili iz minibloterja z aspiracijo in prenesli membrano v kadičko za spiranje. Membrano smo najprej ob stresanju dvakrat 10 min spirali v hibridizacijski pečici pri 60 °C v pufru 2 x SSPE / 0,5 % SDS (100 ml 20 x SSPE, 850 ml destilirane vode in 50 ml 10 % SDS), ki

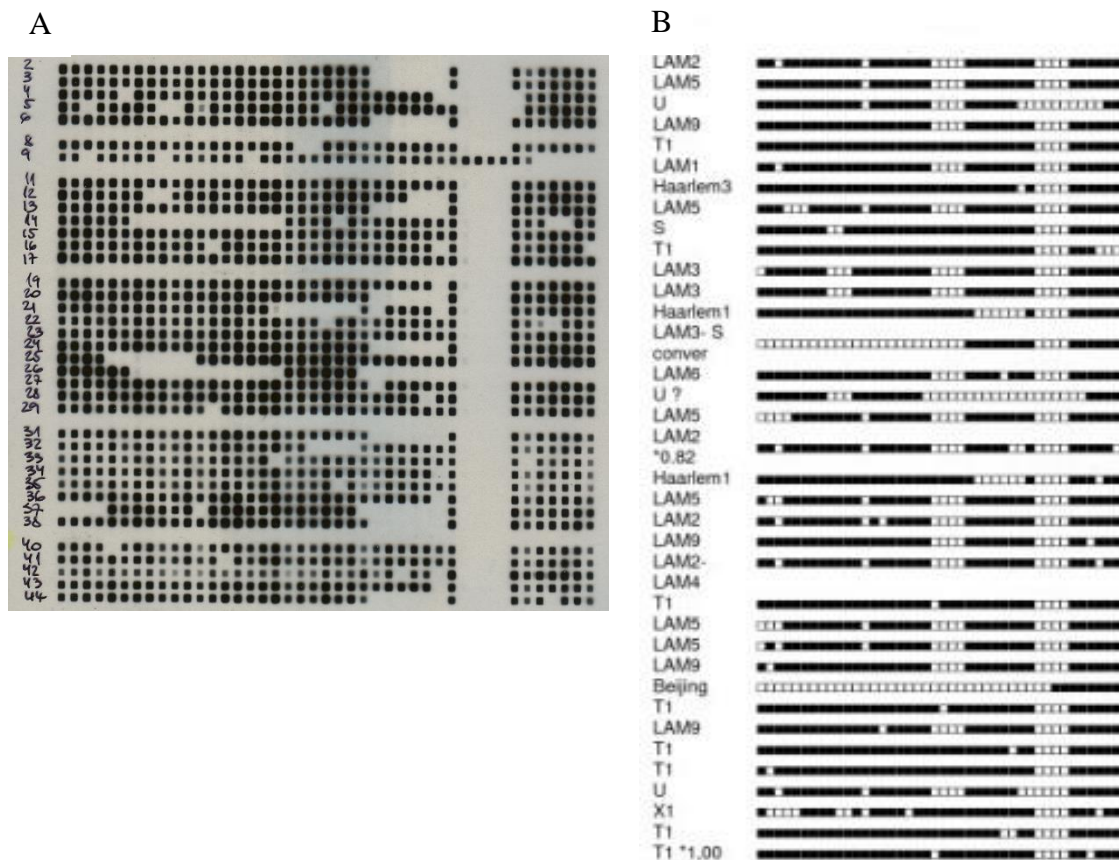
smo ga predhodno segreti v vodni kopeli na 60 °C. Nato smo membrano prenesli v posodo valjaste oblike (»rolling bottle«) in jo pustili, da se ohladi in s tem preprečili inaktivacijo peroksidaze v naslednjem koraku. V 10 ml 2 x SSPE / 0,5 % SDS smo dodali 2,5 µl encima streptavidin-peroksidaza (Streptavidin-POD-conjugate, Roche Diagnostics). Mešanico smo prelili v valjasto posodo z membrano. Valjasto posodo smo namestili v hibridizacijsko pečico segreto na 42 °C. Inkubacija je potekala ob vrtenju valjaste posode 45 minut. Membrano smo nato dvakrat spirali v hibridizacijski pečici 10 minut, pri 42 °C, ob streasanju s pufrom 2 x SSPE / 0,5 % SDS. Na koncu smo membrano sprali še dvakrat po 5 minut, na sobni temperaturi s pufrom 2 x SSPE (100 ml 20 x SSPE, 900 ml destilirane vode). Membrano smo posušili na filter papirju in jo pripravili za detekcijo.

### 3.2.3.3 Detekcija

Detekcija nastalih hibridov - spoligovzorcev je potekala v temnici, pri infrardeči svetlobi z uporabo reagentov iz diagnostičnega kompleta ECL (Amersham Bioscience).

V temnici smo v 50 ml čašo pripravili mešanico detekcijskega reagenta iz 10 ml detekcijskega reagenta 1 in 10 ml detekcijskega reagenta 2, ki morata biti pred uporabo segreta na sobno temperaturo. Mešanico smo prelili v kadičko. Membrano smo prestavili v kadičko in z rahlim mešanjem pustili v kadički 1 min. Nato smo jo položili na filter papir in osušili z filter papirjem. Posušeno membrano smo zavili v folijo za živila in položili v rentgensko kaseto za razvijanje filma in nanjo položili film za razvijanje (Sigma-Aldrich). Kaseto smo zaprli in pustili 1 minuto. Po eni minuti smo membrano vzeli ven iz kasete in film razvili v stroju za razvijanje rentgenskih slik (Dürr Dental GmbH & Co. KG). Glede na intenziteto spoligovzorcev smo izpostavljenost novega filma ustrezno prilagodili, da smo dobili čim boljšo vidnost posameznih spoligotipov. Rezultat metode spoligotipizacije je razviden iz Slike 11.





Slika 11: Primer metode spoligotipizacije (A). Vrstica 8 predstavlja pozitivno kontrolo *M. tuberculosis* H37Ra, vrstica 9 je pozitivna kontrola *M. bovis* BCG, vrstice 7, 10, 16, 30, 39 predstavljajo negativno kontrolo, ostale vrstice so različni slovenski spoligotipi. Primer najpomembnejših svetovnih spoligolinij je predstavljen na sliki B.

Figure 11: Result of spoligotyping method (A). Line 8 is positive control *M. tuberculosis* H37Ra, line 9 is positive control *M. bovis* BCG, lines 7, 10, 16, 30, 39 are negative controls. Other lanes are representing spoligo patterns of Slovenian isolates. Some of the most important world spoligo lineages (B).

### 3.2.3.4 Regeneracija membrane

Hibridizirane PCR produkte smo spirali z membrane s pomočjo postopka regeneracije. Tako smo membrano pripravili za ponovno uporabo. Proizvajalec zagotavlja vsaj 10-kratno možnost uporabe membrane.

Membrano smo spirali dvakrat po 30 minut v 1 % SDS (pripravo smo že opisali v poglavju hibridizacije) v hibridizacijski pečici, ki smo jo segreti na 80 °C. Nato smo jo spirali še 15 minut v 20 mM EDTA (pH 8,0). Raztopino 20 mM EDTA smo pripravili tako, da smo

7,4 g EDTA raztopili v 1 l destilirane vode in ji umerili pH na 8,0. Membrano spo shranili do nadaljne uporabe pri 2-8 °C v plastičnem ovoju, v katerega smo dali nekaj ml destilirane vode in s tem preprečili dehidracijo membrane.

#### 3.2.3.5 Računalniška obdelava podatkov

Podatke na filmu smo pretvorili v digitalno obliko s pomočjo aparata denzitometer 710 (Imaging Densitometer, Bio-Rad). Slike smo obdelali z računalniškim programom Bionumerics verzija 5.1 (Applied Maths). Ta program omogoča vnos binarnih oblik zapisov podatkov in vsak spoligotip poveže z odgovarjajočim bolnikom.

#### 3.2.4 Metoda MIRU-VNTR/24

V letu 2009 je bila metoda molekularne genotipizacije MIRU-VNTR/24 standardizirana z diagnostičnim kompletom MIRU-VNTR (angl. MIRU-VNTR Typing Kit, verzija 1, Genoscreen). Diagnostični komplet je namenjen tipizaciji mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* in omogoča pomnoževanje 24 specifičnih zaporedij izbranih lokusov. Genom *M. tuberculosis* vsebuje variabilno število tandemskih ponovitev (VNTR), različnih genetskih elementov, ki jih imenujemo mikobakterijske ponovljive enote (MIRU). Dolžina ponovljivega zaporedja je znana, zato velikost amplikona odraža število MIRU-VNTR kopij. Rezultat metode je 24 mestna koda. Diagnostični komplet vsebuje 8 reakcijskih mešanic. Vsaka reakcijska mešanica omogoča pomnoževanje treh različnih specifičnih zaporedij. Diagnostični komplet vsebuje tudi pozitivno kontrolo *M.bovis* BCG.

##### 3.2.4.1 Pomnoževanje DNK

Potrebujemo zelo majhno količino izolirane DNK. Zadostuje že 10 ng/μl izolirane mikobakterijske DNK, zato smo uporabili genomsko DNK, ki smo jo izolirali po postopku opisanem v poglavju 3.2.1 Izolacija genomske DNK, ki smo jo redčili v razmerju 1:100. Metodo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Pomnoževanje segmentov DNK smo izvedli v aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Perkin Elmer). V 8 μl ustrezne reakcijske mešanice (triplex1-TRX1, triplex2-TRX2, triplex3-TRX3, triplex4-TRX4,

triplex5-TRX5, triplex6-TRX6, triplex7-TRX7, triplex8-TRX8) smo dodali 2  $\mu$ l izolirane genomske DNK (Preglednica 5). Pred začetkom prvega cikla pomnoževanja smo reakcijsko mešanico inkubirali 15 minut pri 95 °C. Pomnoževanje je potekalo s 40-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla PCR, sestavljenega iz treh inkubacij: 1 min pri 94 °C, 30 s pri 59 °C in 1 min 30 s pri 72 °C. Na koncu je sledila deset minutna inkubacija na 72 °C.

Preglednica 5: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov pri metodi MIRU-VNTR/24.  
Table 5: Primers used for MIRU-VNTR/24 typing method.

Oznaka mešanice	Mesto na genomu	Oligonukleotidni začetniki (lokus)	Dolžina oligonukleotidnega zaporedja	Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov označenih s fluorescentnim barvilom FAM, VIC in NED
TRX1	580	MIRU 4; ETR D	77	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
	802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGCGAAATCAGATA
TRX2	960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
	1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
	3192	MIRU 31; ETR E	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
TRX3	424	Mtub04	51	CTTGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATCTTC (FAM)
	577	ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
	2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT
TRX4	2401	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCACGCCCATTAGTA
	3690	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG
	4156	QUB-4156	59	TGACCACGGATGCTCTAGT GCCGGCTCCATGTT (NED)
TRX5	2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGCCAT (FAM)
	1955	Mtub21	57	AGATCCAGTTGTCTGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
	4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGCCAGGTCCTTCCCGAT
TRX6	154	MIRU 2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)
	2531	MIRU 23	53	CTGTGATGGCCGCAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTGTC
	4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)
TRX7	2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCACCAGGTA
	2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)
	3007	MIRU 27; QUB-5	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
TRX8	2347	Mtub29	57	GCCAGCCGGTGCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
	2461	ETR B	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCACT (VIC) CGACGGGCCATCTGGATCAGCTAC
	3171	Mtub34	54	GGTGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTATTGCTGGAGGGTTGTAC

Legenda: TRX - tripleks

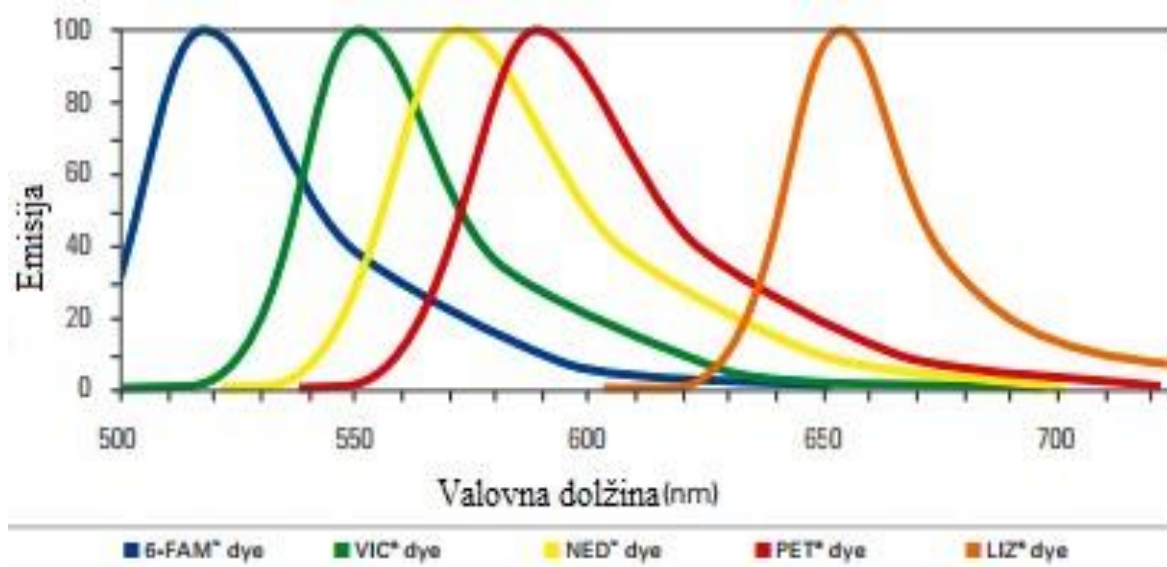
### 3.2.4.2 Fragmentna analiza pomnoženih segmentov DNK

Za vsak vzorec smo pripravili mešanico 9,5 µl formamida (Formamide HiDi, Applied Biosystems, Foster City, ZDA) in 0,5 µl molekularnega označevalca LIZ1200 (GeneScan 1200LIZ size standard, Applied Biosystems). Mešanici smo dodali 2 µl PCR pridelkov. Postopek denaturacije segmentov DNK smo izvedli na aparaturi za pomnoževanje nukleinskih kislin (Perkin Elmer). Denaturacija je potekala 5 min pri 95 °C, nato smo vzorce na hitro ohladili na 4 °C. Ohlajene vzorce smo na hitro centrifugirali (spin down). Fluorescentno označene pridelke PCR smo ločevali z avtomatskim 4-kapilarnim genetskim analizatorjem ABI 3130 (Applied Biosystems), ob uporabi tekočega polimera POP-7 (Applied Biosystems) in notranjega molekularnega označevalca LIZ1200 (Applied Biosystems). Genetski analizator je umerjen z diagnostičnim kompletom MIRU-VNTR Calibration kit (Genoscreen).

Vrhovi molekularnega označevalca LIZ1200 (Applied Biosystems) (68):

20.0, 30.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 114.0, 120.0, 140.0, 160.0, 180.0, 200.0, 214.0, 220.0, 240.0, 250.0, 260.0, 280.0, 300.0, 314.0, 320.0, 340.0, 360.0, 380.0, 400.0, 414.0, 420.0, 440.0, 460.0, 480.0, 500.0, 514.0, 520.0, 540.0, 560.0, 580.0, 600.0, 614.0, 620.0, 640.0, 660.0, 680.0, 700.0, 714.0, 720.0, 740.0, 760.0, 780.0, 800.0, 820.0, 840.0, 850.0, 860.0, 880.0, 900.0, 920.0, 940.0, 960.0, 980.0, 1000.0, 1020.0, 1040.0, 1060.0, 1080.0, 1100.0, 1120.0, 1160.0, 1200.0.

Genetski analizator ABI 3130 je 4-kapilarni sistem, ki hkrati lahko analizira štiri vzorce v katerih so trije različni pridelki PCR, označeni s tremi različnimi fluorescentnimi barvili (6-FAM, VIC, NED). Barvila se med seboj razlikujejo po spektralnih značilnostih, zato je za vsako izmed njih značilno, da oddaja fluorescenco pri drugi valovni dolžini (Slika 12). Najkrajšo valovno dolžino oddaja 6-FAM (modra barva), sledijo VIC (zelena barva), NED (rumena barva), PET (rdeča barva) in standard LIZ (oranžna barva). Z uporabo treh različnih barvil smo analizirali kombinacije treh lokusov v eni sami analizi.



Slika 12: Metoda MIRU-VNTR/24. Emisijski spektri štirih barvil in standarda LIZ 1200.

Figure 12: MIRU-VNTR/24 method. Spectral emission of blue, green, yellow and red color and LIZ 1200 standard.

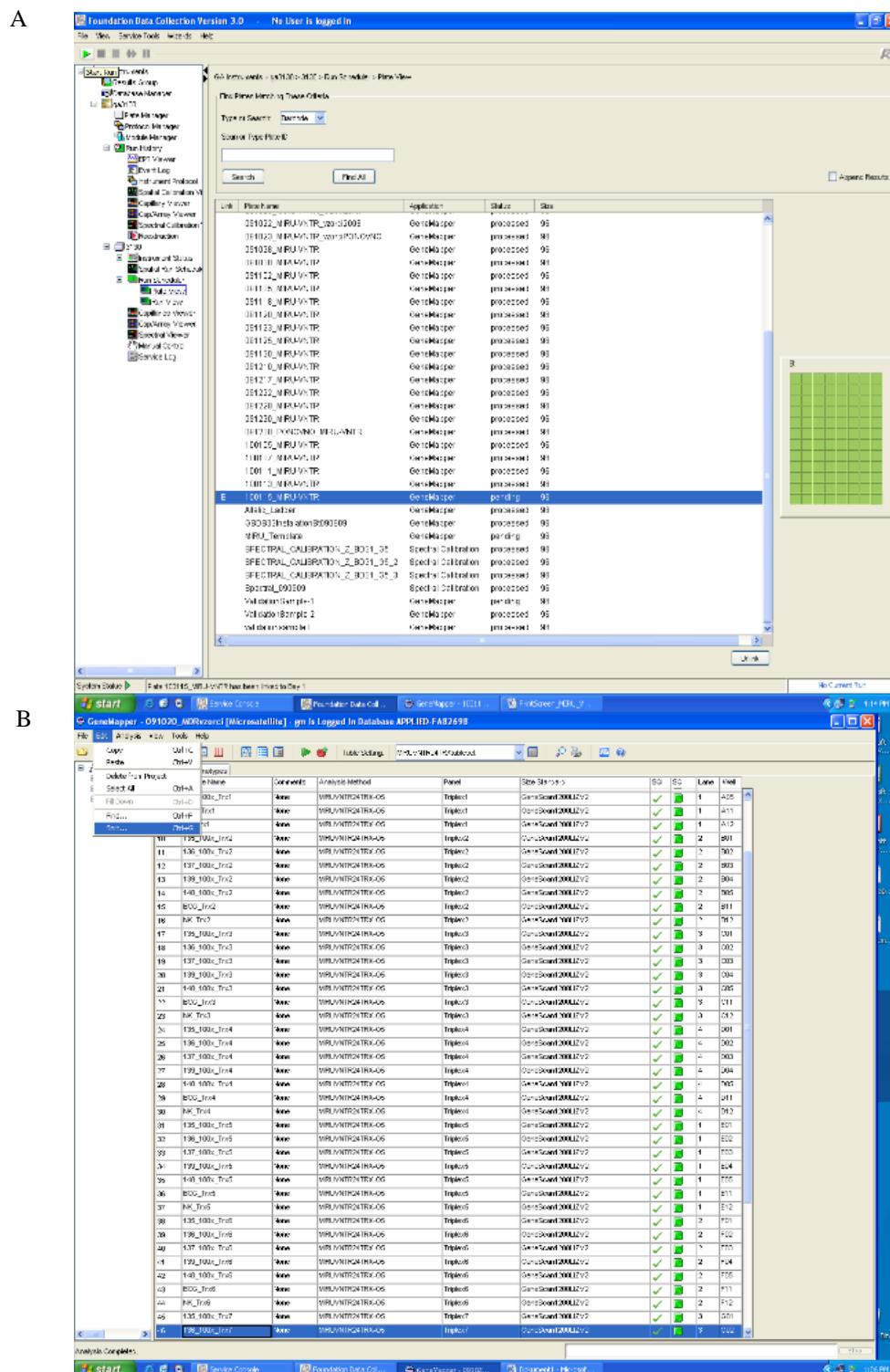
Fragmentno analizo pridelkov PCR smo izvedli s pomočjo programa genskega analizatorja (Foundation Data collection verzija 3,0, Genetic Analyzer software, Applied Biosystems), dobljene podatke pa smo uvozili in analizirali s pomočjo programskega paketa GeneMapper verzija 4,0 (Fragment analysis software, Applied Biosystems) (Slika 13).

Pri analizi podatkov smo najprej pregledali genetski označevalec za vsak lokus pri posameznem vzorcu. V kolikor potek označevalca ni bil pravilen smo ga ročno popravili in označili vrhove po predpisanem zaporedju. Z natančno lego vseh vrhov označevalca smo normalizirali rezultate fragmentne analize vsakega lokusa določenega vzorca. Z omenjenim programom smo pridobili podatke o prisotnosti, dolžinah alelov in intenziteti fluorescentnega signala. Program omogoča sprotno označevanje števila ponovitev oligonukleotidnih zaporedij (velikost pridelka PCR (bp) spremeni v število ponovitev) (Preglednica 7). Rezultat analize je genotip v obliki 24-mestne kode (Preglednica 6).

Preglednica 6: Primer rezultata metode MIRU-VNTR (tabela excel).

Table 6: Result of MIRU-VNTR typing method (excel table).

Priimek in ime	Birpis	Datum odv.	Protokol MBL	MIRU-VNTR/24 LOKUS																							
				580	2996	1955	802	960	2163b	1644	3192	424	577	4052	2165	154	2531	2401	4348	2059	2687	4156	3007	2347	2461	3690	3171
ČB	258563	29.5.2015	3661/15	4	5	2	6	3	3	1	2	3	4	5	3	2	5	2	2	2	1	2	3	4	2	3	3
MR	217436	26.5.2015	3557/15	3	5	1	5	3	4	3	2	3	4	4	3	2	5	2	2	2	1	2	2	4	2	3	3
MM	258674	5.6.2015	3833/15	2	4	6	4	4	6	3	3	2	3	4	3	2	5	4	2	2	1	3	3	4	2	3	3
DM	NLZOH MB	3967/15		2	4	2	4	3	2	3	3	3	4	7	2	2	4	2	2	2	1	2	3	4	2	3	3
PJ	NLZOH MB	3968/15		2	6	2	4	3	3	2	3	1	4	6	3	2	5	2	2	2	1	2	2	4	2	3	3



Slika 13: Metoda MIRU-VNTR/24. Fragmentna analiza v programu Foundation Data collection verzija 3,0 (A) in analiza podatkov v programu GeneMapper verzija 4,0 (B).

Figure 13: MIRU-VNTR/24 method. Fragment analysis in Foundation Data collection program ver. 3,0 (A) and analysis of results in GeneMapper program ver. 4,0 (B).





### 3.2.4.3 Računalniška obdelava podatkov

Podatke smo iz programa GeneMapper izvozili v program Excel in jih vnesli v program Bionumerics verzija 5.1 (Applied Maths). Program omogoča vnos tabelaričnih oblik zapisov podatkov in vsak genotip poveže z odgovarjajočim bolnikom.

### 3.2.5 Proces obdelave in ekstrakcije DNK in ekstrakcije DNK iz kliničnih vzorcev

Klinične vzorce, ki smo jih v Laboratorij za mikobakterije prejeli v namen tipizacije smo po standardnem laboratorijskem postopku dekontaminirali in homogenizirali z metodo NALC – NaOH (Rieder in sod., 1998), da smo pridobili kakovosten sediment. Iz sedimenta smo še isti dan pripravili mikroskopski preparat, ki smo ga pobarvali z fluorescentno metodo po auraminu (Rieder in sod., 1998). Na osnovi števila acidno- in alkoholoodpornih bacilov (ARB) v mikroskopskem preparatu smo razvrstili vzorce v pet skupin glede na njihovo pozitivnost (Preglednica 8):

Preglednica 8: Ocena mikroskopske pozitivnosti vzorcev. Barvanje po auraminu.  
Table 8: Microscopic positivity of clinical samples. Auramin staining.

Število bacilov / vidno polje	Oznaka pozitivnosti
> 10 bacilov / vidno polje	3+
1 - 10 bacilov / vidno polje	2+
10 - 99 bacilov / 100 vidnih polj	1+
7 - 9 bacilov / 100 vidnih polj	2 ARB
3 - 6 bacilov / 100 vidnih polj	1 ARB

Sediment iz vzorca smo nacepili v tekoče gojišče MGIT (500 µl) in na trdno gojišče Löwenstein-Jensen (LJ, 500 µl). Tekoče gojišče MGIT smo postavili v polavtomatski aparat MGIT BACTEC 960 (Becton Dickinson, ZDA), ki je ob porabi kisika v epruveti zaznal in opozoril z rdečo signalno lučjo, da je v epruveti prišlo do spremembe. Tako epruveto smo iz aparata izločili in z mikroskopskim preparatom iz vsebine epruvete preverili ali so v njej porasle mikobakterije iz sklopa *M. tuberculosis*. Trdno gojišče LJ

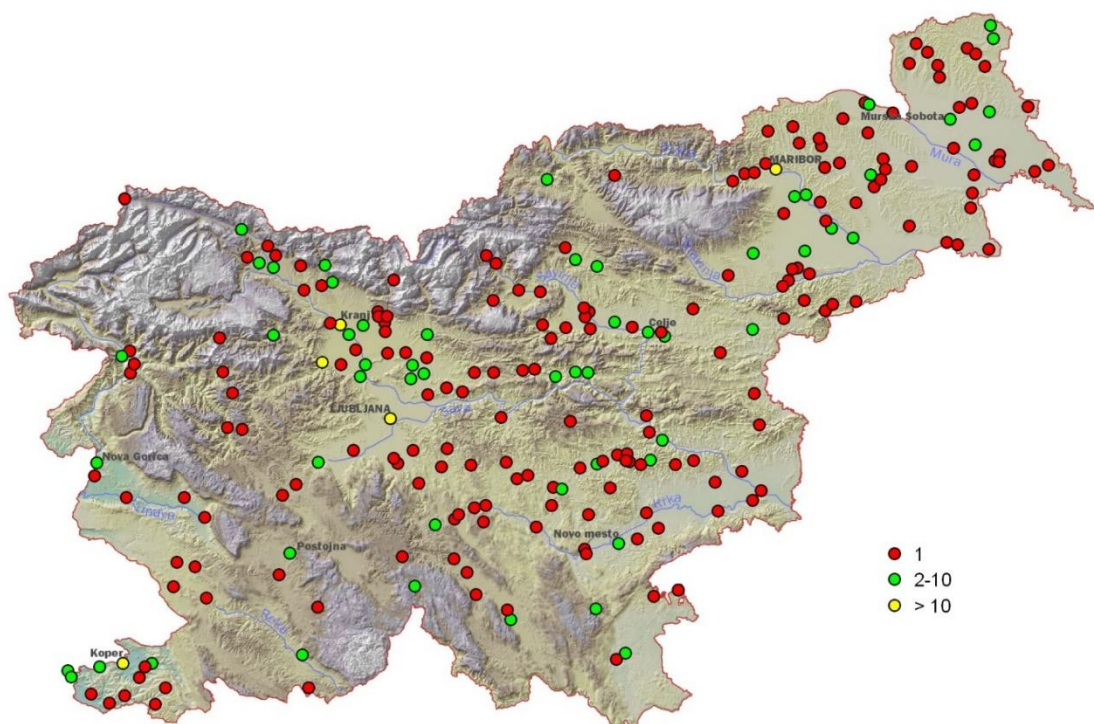
smo postavili v termostat na 37 °C, do pojava morfološko ustrezne rasti. Dnevno smo pregledovali rast na gojišču. Bacile tuberkuloze, ki so porasli v tekočem in trdnem gojišču smo uporabili za ekstrakcijo mikobakterijske DNK iz kulture (Supply, 2005). Rezultat tipizacije te skupine nam je služil kot vzporedna kontrola rezultatom tipizacije iz kliničnih vzorcev. Preostanek sedimenta smo uporabili za metodo ekstrakcije iz kliničnih vzorcev. Postopali smo po navodilu primernem za bakterijsko kulturo (Supply, 2005). Celoten sediment smo centrifugirali (11600g, 15 min) in tako odstranili možen preostanek pufrov, ki so ostali po dekontaminaciji. Dobljeni sediment smo zmešali z 200 µl pufera TE (pH 7). Puffer TE smo pripravili tako, da smo 1,861 g EDTA (Sigma-Aldrich) dodali 50 ml pripravljene raztopine 100 mM Tris / HCl in dopolnili s sterilno vodo do 500 ml. Puffer smo redčili z destilirano vodo v razmerju 1:10. Puftru smo uravnali pH in ga avtoklavirali 20 min pri 121 °C. Sediment in puffer TE smo kratko premešali na namiznem mešalu in inkubirali 45 minut pri 95 °C. Po inkubaciji smo vzorec ohladili na sobno temperaturo in ga ponovno centrifugirali (11600g, 15 min). Supernatant smo prestavili v novo epruveto in ta nam je služil kot izhodiščna ekstrahirana DNK, ki smo jo uporabili za tipizacijo z metodo MIRU-VNTR/24.

Genotipizacija bacilov tuberkuloze iz kliničnih vzorcev je bila izvedena po protokolu, ki je opisan v poglavju 3.2.4 Metoda MIRU-VNTR/24.

V primeru, da nismo dobili popolnega rezultata tipizacije (24 mestna koda) v prvem poskusu, smo ponovili pomnoževanje PCR pridelkov in fragmentno analizo z metodo MIRU-VNTR/24. Drugi rezultat smo upoštevali kot končen rezultat za analizo.

Vzporedno je bila narejena tudi tipizacija iz bakterijskih kultur iz pripadajočih vzorcev, ki je služila kot kontrola rezultata tipizacije iz kliničnih vzorcev. Tipizacija je bila narejena po izvornem protokolu za tipizacijo mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis* iz bakterijskih kultur (Supply, 2005).

### 3.3 RAČUNALNIŠKA ANALIZA PODATKOV



Slika 14: Geografska razporeditev bolnikov s tuberkulozo v Sloveniji v letih 2006-2009 (576 bolnikov), glede na njihovo prebivališče v času zdravljenja. Z rdečo piko so označeni posamezni primeri, z zeleno skupina bolnikov velikosti 2-10, z rumeno piko pa so označeni kraji, kjer je gostota primerov s tuberkulozo > 10 bolnikov (Register za tuberkulozo, 2014b).

Figure 14: Geographical distribution of 569 patients with tuberculosis in Slovenia. Red dot represents individual case of tuberculosis patient, green dot represents group large 2 to 10 tuberculosis patients and yellow dot represent the largest groups of tuberculosis patients in Slovenia, larger than 10 (Register for tuberculosis, 2014b).

Geografsko razširjenost tuberkuloze v letih 2006-2009 smo prikazali na karti, ki smo jo izrisali s programom ArcView ver. 3.1. Podatke o stalnem prebivališču bolnikov s tuberkulozo smo pridobili na Registru za tuberkulozo Golnik in jih računalniško obdelali v programu Excel. Uporabili smo podatek o stalnem oziroma začasnem prebivališču bolnikov s tuberkulozo (ime naselja), ki so ga bolniki navedli ob začetku zdravljenja. Upoštevali smo evidenco naselij Geodetske uprave Republike Slovenije.

Geografska razširjenost tuberkuloze v letih od 2007 do 2009 nakazuje njeno razpršenost po celotni državi. Po pričakovanjih je njena največja pojavnost v največjih slovenskih krajih (Slika 14).

Rezultate vseh metod tipizacije smo vnesli v računalniški program Bionumerics (verzija programa 5.1, Applied Maths). Pri vseh treh metodah tipizacije smo določili pojem genetske družine (angl. cluster). Genetska družina je skupina izolatov, ki ima popolnoma identičen genotip, ne glede na uporabljeno metodo tipizacije. Najmanjša genetska družina lahko vsebuje le 2 izolata/identična genotipa. Vse ostale izolate in njihove pripadajoče genotipe, ki se ne uvrščajo v nobeno izmed genetskih družin, smo poimenovali unikatni genotipi.

Genotipi v genetskih družinah so lahko povezani ne le z metodo tipizacije, ampak tudi s podatki epidemiološke službe (Register za tuberkulozo). V tem primeru govorimo o mikroepidemijah. To so skupine genotipov, ki so povezane z metodo tipizacije in hkrati z epidemiološkimi podatki. V definiciji mikroepidemije obstaja tudi izjema k pravilu, ki pravi, da lahko genotip določen z metodo tipizacije (RFLP in MIRU-VNTR/24), ki se od genotipa v genetski družini razlikuje za en pas oziroma za eno število znotraj 24-mestne kode in je v genetsko družino povezan z epidemiološkimi podatki, uvrstimo v genetsko družino. Torej lahko znotraj genetske družine najdemo tudi genotip, ki se od ostalih genotipov razlikuje za največ en pas oziroma en lokus, vendar je z ostalimi genotipi povezan epidemiološko.

Za analizo podatkov dobljenih z metodo RFLP IS6110 smo uporabili algoritem UPGMA, s koeficientom podobnosti Dice in z 1,0 odstotno toleranco zamika med pasovi. Za analizo podatkov metode spoligotipizacije in MIRU-VNTR/24 smo prav tako uporabili dendrogram UPGMA in kategorični koeficient podobnosti (angl. Categorical).

### 3.4 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Za vse tri metode tipizacije bacilov tuberkuloze smo določili število genetskih družin, ki jih prepozna posamezna tipizacijska metoda, število izolatov, ki se nahajajo v posamezni

genetski družini (velikost genetske družine), število unikatnih genotipov, število vseh različnih genotipov (genotipi v genetskih družinah združeni z unikatnimi genotipi = genetska raznolikost), indeks moči razlikovanja genotipizacijske metode po Hunter-Gastonu in stopnjo razvrščanja v genetske družine (angl. strain clustering rate) oziroma stopnja nedavnega prenosa.

Delež števila izolatov v genetskih družinah smo izračunali tako, da smo število vseh izolatov v genetskih družinah delili s številom vseh izolatov, ki smo jih tipizirali. Delež števila unikatnih genotipov smo izračunali tako, da smo število vseh unikatnih genotipov delili s številom vseh izolatov, ki smo jih tipizirali. Genetsko raznolikost smo izračunali tako, da smo število vseh različnih genotipov delili s številom vseh izolatov, ki smo jih tipizirali.

Da bi raziskali kakšna je moč razlikovanja metod za tipizacijo izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* smo uporabili indeks po Hunter-Gastonu (HGDI, angl. Hunter-Gaston discriminatory index) (Hunter in Gaston, 1988). Indeks smo izračunali s spodaj navedeno enačbo:

$$\text{HGDI} = 1 - \left[ \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1) \right] \quad \dots (1)$$

Neznanke v enačbi predstavljajo;  $N$  je število vseh izolatov, ki smo jih tipizirali,  $s$  je število vseh različnih genotipov določenih z metodo RFLP ali spoligotipizacijo ali MIRU-VNTR/24 in  $n_j$  je število izolatov, ki pripada  $j$ -temu genotipu. Stopnjo razvrščanja v genetske družine (angl. strain clustering rate) oziroma stopnjo nedavnega prenosa smo izračunali tako, da smo od števila izolatov v genetskih družinah odšteli število genetskih družin. Dobljeno razliko smo delili s številom vseh izolatov, ki smo jih tipizirali (Allix-Beguec in sod., 2008a).

Primarni cilj statistične analize v raziskavi možnosti tipizacije iz kliničnih vzorcev je bil poiskati povezave med dvema skupinama vzorcev, ki smo jih tipizirali. Prva skupina so prvi vzorci novo odkritih bolnikov s tuberkulozo ( $n = 26$ ), drugo skupino sestavljajo vzorci, ki smo jih zbirali do prvega mikroskopsko negativnega vzorca pri istih pacientih ( $n = 53$ ). S tem smo želeli ugotoviti ali čas in trajanje zdravljenja vplivata na uspešnost tipizacije iz kliničnih vzorcev.

Porazdelitev podatkov smo določili z uporabo koeficienta po D'Agostino-Pearsonu. Spearmanov korelacijski koeficient smo uporabili za ugotavljanje linearne povezanosti med obema skupinama vzorcev. Statistične analize smo opravili z uporabo programske opreme GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, ZDA) in stopnjo zaupanja  $p < 0,05$  kot statistično značilno.

### 3.5 EPIDEMIOLOŠKI PODATKI

Epidemiološke podatke o bolnikih, smo pridobili iz Registra za tuberkulozo Klinike Golnik. Pri razporejanju bolnikov in določanju koledarskega leta, povezanega z izolatom bakterij iz sklopa *M. tuberculosis*, smo se ravnali po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije. Tako smo za leto registracije bolnika, določili datum začetka zdravljenja tuberkuloze. Vse manjkajoče podatke, ki smo jih potrebovali za uspešno analizo smo pridobili iz Registra za tuberkulozo na podlagi dogovora po telefonu ali po e-pošti.

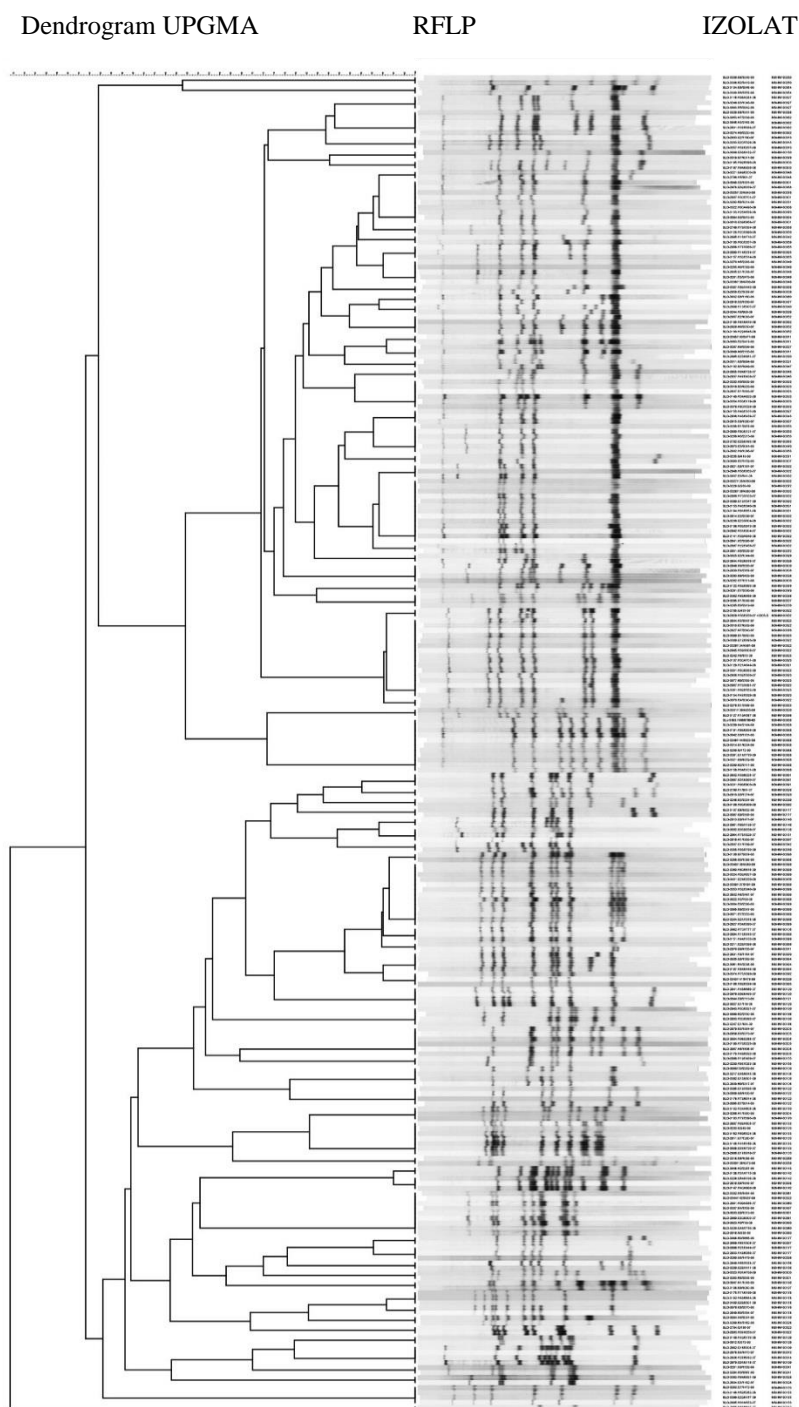
## 4 REZULTATI

### 4.1 ANALIZA GENOTIPOV DOBLJENIH Z METODO RFLP

Triletna analiza tipizacije izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* ( $n = 576$ ) je z metodo RFLP razporedila izolate v 78 genetskih družin (Slika 15). V okviru teh družin je bilo 269 (46,7 %) od skupno 576 izolatov. Več kot polovica 307 (53,3 %) genotipov je bilo unikatnih in niso pripadali nobeni genetski družini.

Največje število izolatov v posamezni genetski družini je bilo 16, najmanjše 2. Največ je bilo genetskih družin z dvema izolatoma (42; 84 izolatov), sledile so genetske družine s po 3 izolati (15; 45 izolatov) in genetske družine s po 4 izolati (9; 36 izolatov). Dve genetski družini sta obsegali po 5 izolatov in 3 družine po 6 izolatov. Vse ostale genetske družine s številom izolatov 7, 8, 9, 11, 12, 13 in 16 so zastopane 1-krat.

Z metodo RFLP smo dobili 385 različnih genotipov (78 znotraj genetskih družin, 307 unikatnih genotipov). Stopnja razvrščanja v genetske družine (stopnja nedavnega prenosa) je bila 33,2 %. Hunter-Gastonov koeficient je pokazal zelo visoko moč razlikovanja bacilov tuberkuloze s to metodo (HGDI = 0,9831).



Slika 15: Metoda RFLP. Dendrogram sorodnosti genetskih družin (n=78) 576 izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* dobljenih z metodo RFLP. Za analizo podatkov smo uporabili program Bionumerics, dendrogram UPGMA in koeficient podobnosti Dice z 1,0 % intervalom zaupanja.

Figure 15: IS6110 RFLP method. Genetic clusters (n=78) analyzed with IS6110 RFLP method from 576 *M. tuberculosis* complex isolates. Analysis was performed with Bionumerics program, UPGMA dendrogram and Dice coefficient with 1,0 % band-position tolerance.



#### 4.2 ANALIZA GENOTIPOV DOBLJENIH Z METODO SPOLIGOTIPIZACIJE

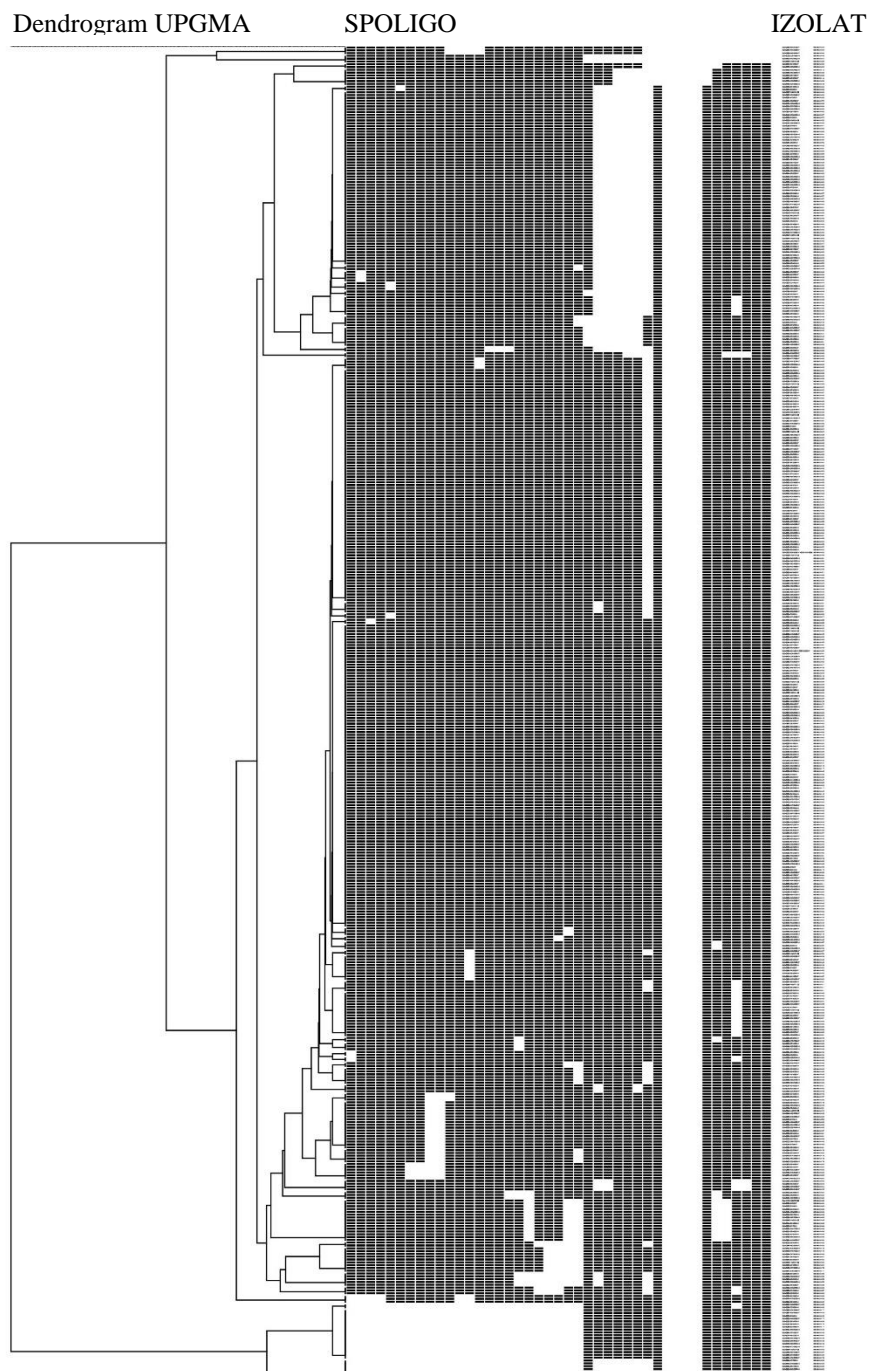
Analiza tipizacije izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* ( $n = 576$ ) je za enako triletno obdobje z metodo spoligotipizacije razporedila izolate v 50 genetskih družin (Slika 16). V okviru teh je bilo 474 (82,3 %) od skupno 576 izolatov. Manj kot ena petina 102 (17,7 %) genotipov je bilo unikatnih in niso pripadali nobeni genetski družini.

Največje število izolatov v posamezni genetski družini je bilo 108, najmanjše 2. Največ je bilo genetskih družin z dvema izolatoma (16; 32 izolatov), sledile so genetske družine s po 3 izolati (11; 33 izolatov) in genetske družine s po 4 izolati (6; 24 izolatov). Dve genetski družini sta obsegali 5 izolatov, štiri družine so obsegale 6 izolatov, dve družini sta obsegali 7 izolatov in dve po 9 izolatov. Vse ostale genetske družine s številom izolatov 15, 16, 17, 18, 62, 83 in 108 so zastopane 1-krat.

Z metodo spoligotipizacije smo dobili 152 različnih genotipov (50 znotraj genetskih družin, 102 unikatna genotipa). Stopnja razvrščanja v genetske družine (stopnja nedavnega prenosa) je bila 73,6 %.

Hunter-Gastonov koeficient je pokazal najnižjo moč razlikovanja bacilov tuberkuloze (HGDI = 0,8942) v primerjavi z ostalima dvema metodama tipizacije.

Metoda spoligotipizacije zelo dobro loči in razvršča izolate iz sklopa *M. tuberculosis* v svetovne genetske družine/linije. Izmed 576 izolatov se jih največ uvršča v svetovno genetsko linijo Haarlem (47,05 %). Druga največja genetska linija v Sloveniji je linija T (37,15 %), ki združuje sodobne izolate tuberkuloze (Preglednica 9, Slike 17-20).



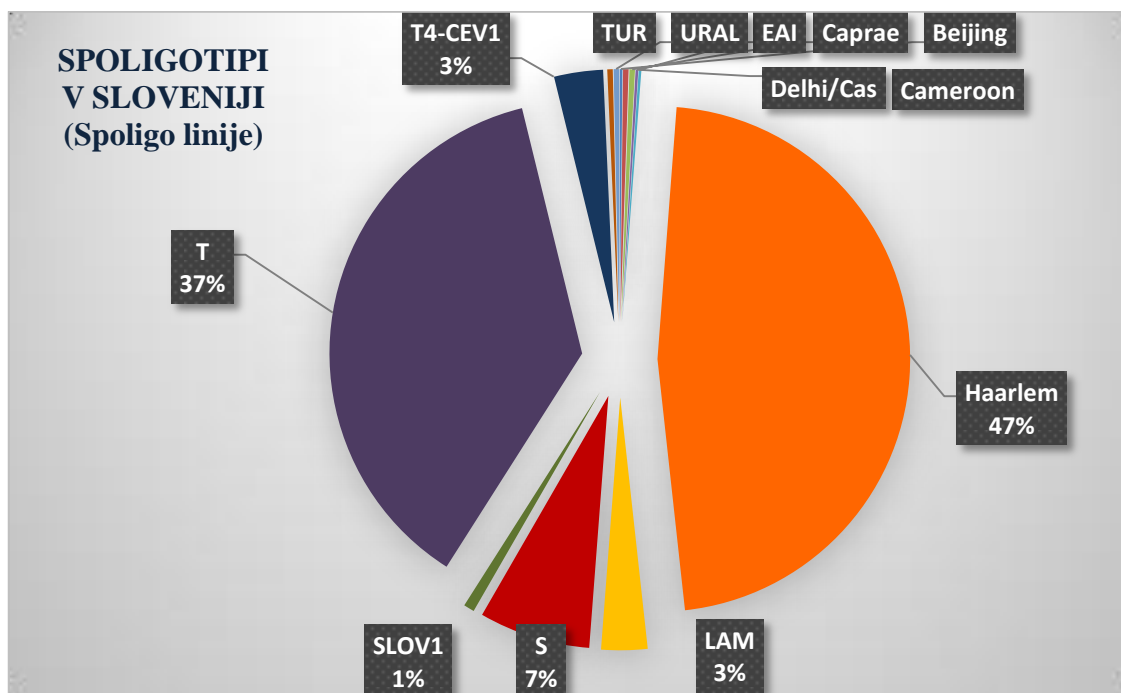
Slika 16: Metoda spoligotipizacije. Dendrogram sorodnosti genetskih družin (n=50) 576 izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* dobljenih z metodo spoligotipizacije. Za analizo podatkov smo uporabili program Bionumerics, dendrogram UPGMA in kategorični koeficient podobnosti.

Figure 16: Spoligotyping method. Genetic clusters (n=50) analyzed with spoligotyping method from 576 *M. tuberculosis* complex isolates. Analysis was performed with Bionumerics program, UPGMA dendrogram and Categorical coefficient.

Preglednica 9: Uvrščanje slovenskih izolatov v svetovno bazo podatkov SpolDB4. Slovenski izolati (N=576) so bili uvrščeni v 13 različnih svetovnih linij. Največ slovenskih izolatov pripada liniji Haarlem, sledi linija T in S.

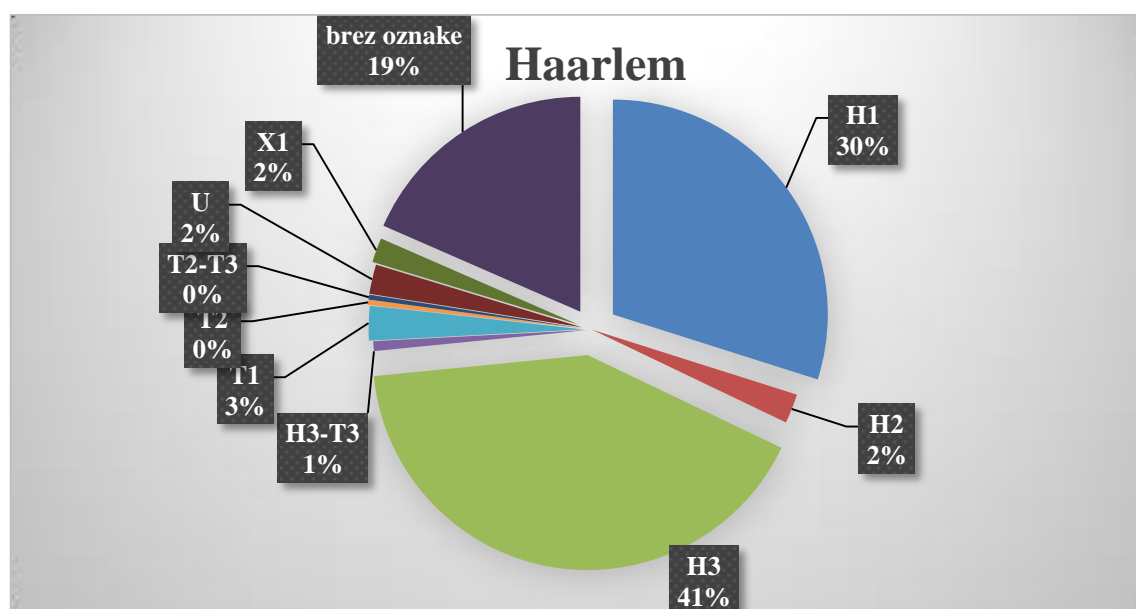
Table 9: SpolDB4 database revealed 13 different spoligotypes among 576 Slovenian isolates. Most common Slovenian spoligotype belongs to Haarlem lineage.

<b>SPOLIGOTIPI V SLOVENIJI</b>			
<b>Linija</b>	<b>Število izolatov v Spoligo linijah (%)</b>	<b>Spoligo podlinija</b>	<b>Število izolatov v Spoligo podlinijah</b>
<b>Beijing</b>	1 (0,17)	Beijing	1
<b>Cameroon</b>	2 (0,35)	LAM10_CAM	2
<b>Caprae</b>	2 (0,35)	CAP	2
<b>Delhi/Cas</b>	1 (0,17)	CAS1_KILI	1
<b>EAI</b>	1 (0,17)	EAI	1
<b>Haarlem</b>	271 (47,05)	H1	81
		H2	6
		H3	112
		H3-T3	2
		T1	7
		T2	1
		T2-T3	1
		U	6
		X1	5
		brez oznake	50
<b>LAM</b>		17 (2,95)	LAM9
	T1		2
	T5		1
	U		1
	brez oznake		3
<b>S</b>	41 (7,12)	S	41
<b>SLOV1</b>	4 (0,69)	SLOV1	4
<b>T</b>	214 (37,15)	T1	132
		T2	18
		T3	9
		T5	4
		ostalo	51
<b>T4-CEV1</b>	18 (3,13)	T4-CEV1	18
<b>TUR</b>	2 (0,35)	TUR	2
<b>URAL</b>	2 (0,35)	URAL	2
<b>Σ</b>	<b>576 (100)</b>		<b>576</b>



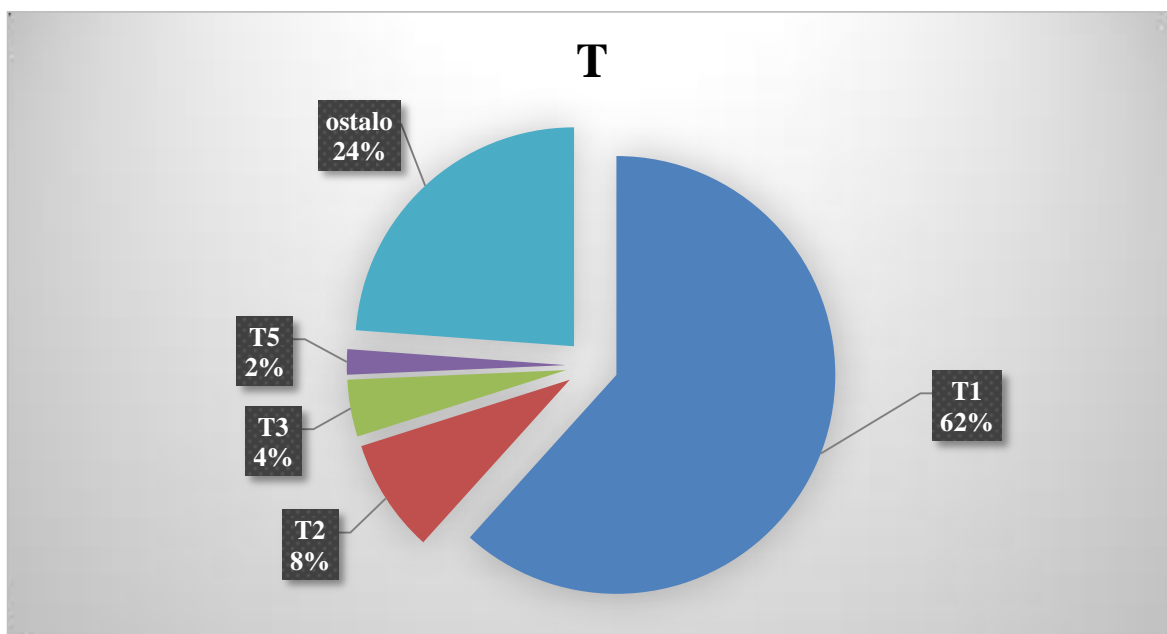
Slika 17: Spoligotipi v Sloveniji. Baza podatkov SpolDB4 je slovenske izolate (N=576) uvrstila v 13 različnih svetovnih linij. Največ slovenskih izolatov pripada liniji Haarlem, sledi linija T in S.

Figure 17: Spoligotype in Slovenia. SpolDB4 database revealed 13 different spoligotypes among 576 Slovenian isolates. Most common Slovenian spoligotype belongs to Haarlem lineage.



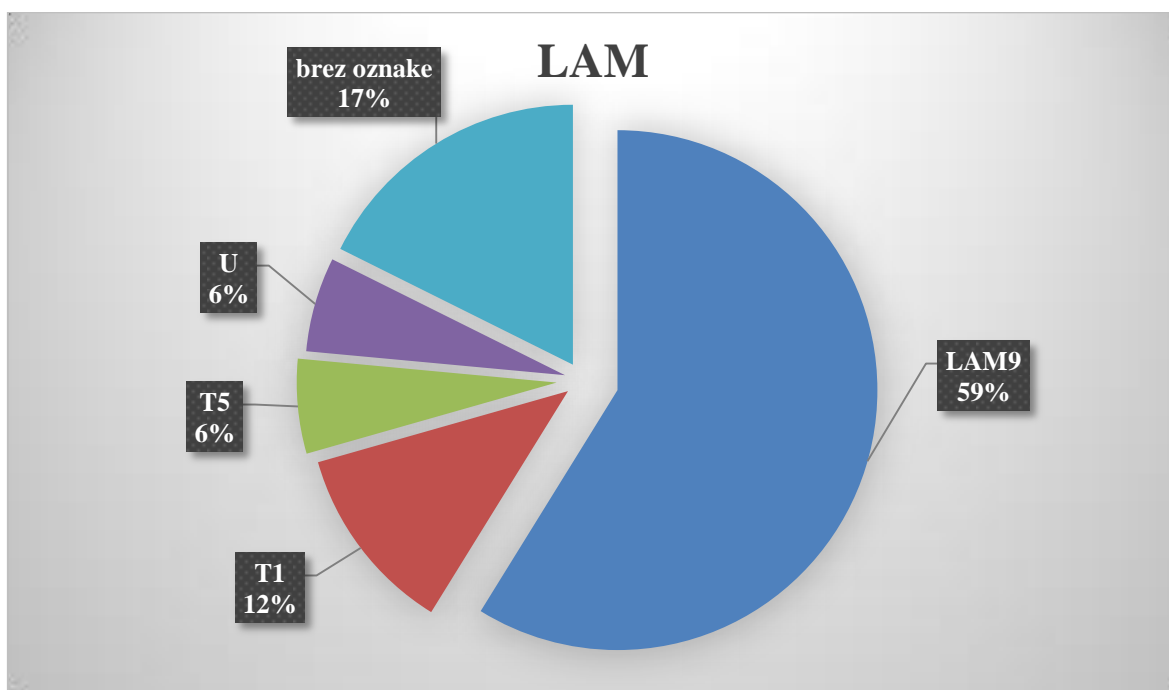
Slika 18: Spoligolinija Haarlem v Sloveniji. Spoligolinija Haarlem je med slovenskimi izolati (N=576) najbolj zastopana in ima 10 različnih podlinij.

Figure 18: Spoligotype Haarlem in Slovenia. Among Slovenian isolates (N=576) is most prevalent lineage Haarlem and is divided into 10 different sublineages.



Slika 19: Spoligolinija T v Sloveniji. Spoligolinija T je med slovenskimi izolati (N=576) druga najbolj zastopana in ima 5 različnih podlinij.

Figure 19: Spoligotype T in Slovenia. Among Slovenian isolates (N=576) is second most prevalent lineage T and is divided into 5 sublineages.



Slika 20: Spoligolinija LAM v Sloveniji. Spoligolinija LAM je med slovenskimi izolati (N=576) ima 5 različnih podlinij.

Figure 20: Spoligotype LAM in Slovenia. Among Slovenian isolates (N=576) is also present lineage LAM and is divided into 5 sublineages.

#### 4.3 ANALIZA GENOTIPOV DOBLJENIH Z METODO MIRU-VNTR/24

Analiza tipizacije izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* (n = 576) je z metodo MIRU-VNTR/24 razporedila izolate v 75 genetskih družin (Slika 21). Znotraj le teh je bilo 272 (47,2 %) od skupno 576 izolatov. Podobno kot z metodo RFLP smo tudi s to metodo dobili več kot polovico 304 (52,8 %) unikatnih genotipov, ki niso pripadali nobeni genetski družini.

Največje število izolatov v posamezni genetski družini je bilo 17, najmanjše 2. Največ je bilo genetskih družin z dvema izolatoma (39; 78 izolatov), sledila je genetska družina s 3 izolati (12; 36 izolatov) in genetska družina s 4 izolati (8; 32 izolatov).

Dve genetski družini sta obsegali 5 izolatov, sedem genetskih družin je obsegalo 6 izolatov, dve genetski družini pa sta obsegali 7 izolatov. Vse ostale genetske družine s številom izolatov 8, 9, 11, 15 in 17 so zastopane 1-krat.

Z metodo MIRU-VNTR/24 smo dobili 379 različnih genotipov (75 znotraj genetskih družin, 304 unikatnih genotipov). Stopnja razvrščanja v genetske družine (stopnja nedavnega prenosa) je bila 34,2 %.

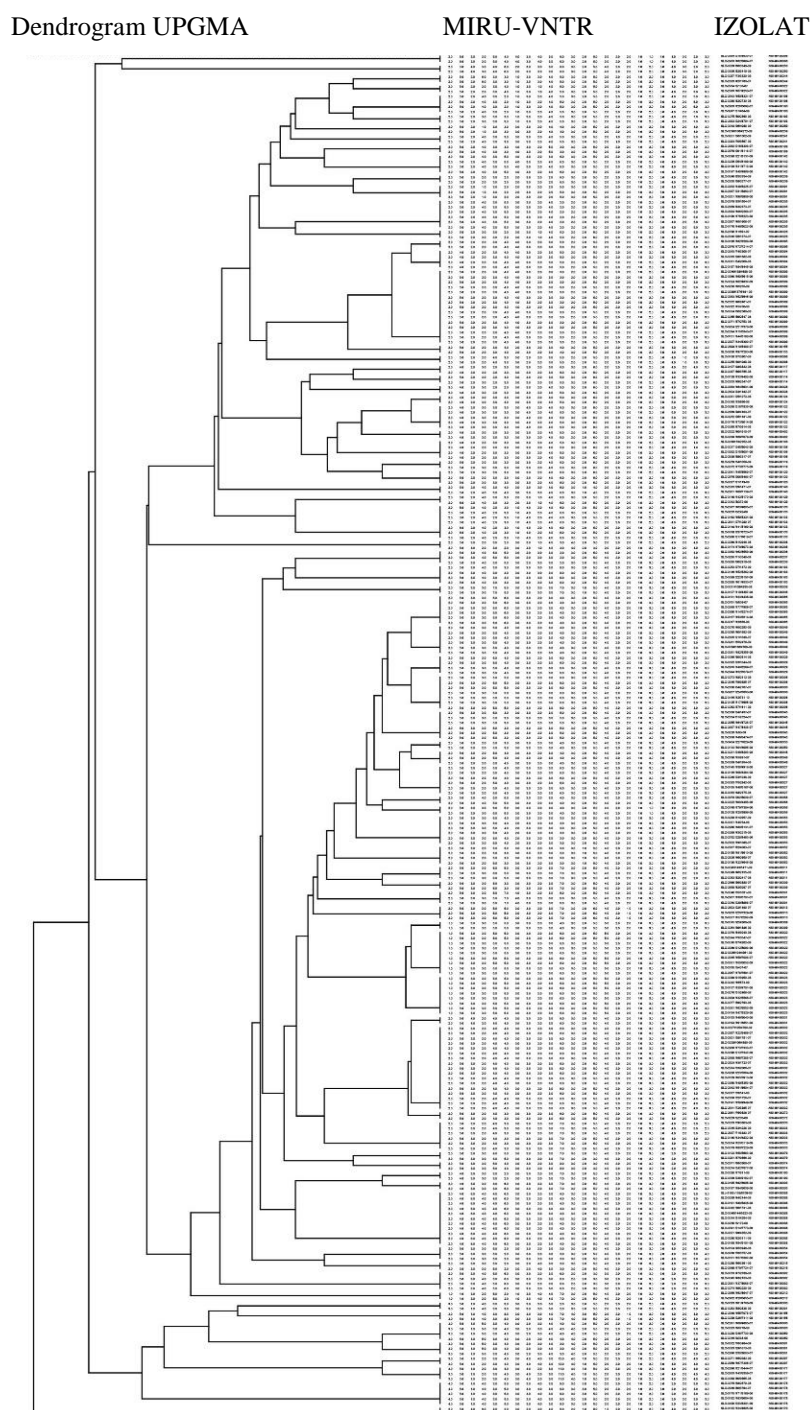
Hunter-Gastonov koeficient je pokazal zelo podobno moč razlikovanja bacilov tuberkuloze (HGDI = 0,9824) v primerjavi z metodo RFLP.

Genetske družine, ki smo jih dobili (75) smo označili s sledečimi oznakami in pripadajočim številom izolatov (Preglednica 10).

Preglednica 10: 75 genetskih družin dobljenih z metodo MIRU-VNTR. Oznaka genetske družine je sestavljena iz kode države (NSI), metode s katero je določena genetska družina (MV, MIRU-VNTR) in zaporedne številke genetske družine.

Table 10: 75 clusters revealed by MIRU-VNTR method. Name of cluster is composed from nationality of the isolate (NSI), method from which cluster was made (MV, MIRU-VNTR) and number of the cluster.

Zaporedna številka genetske družine	Oznaka genetske družine	število izolatov v genetski družini	Zaporedna številka genetske družine	Oznaka genetske družine	število izolatov v genetski družini
1	NSI-MV-00146	3	41	NSI-MV-00001	3
2	NSI-MV-00129	2	42	NSI-MV-00027	6
3	NSI-MV-00133	7	43	NSI-MV-00050	2
4	NSI-MV-00328	2	44	NSI-MV-00048	3
5	NSI-MV-00114	2	45	NSI-MV-00031	2
6	NSI-MV-00117	2	46	NSI-MV-00032	17
7	NSI-MV-00120	3	47	NSI-MV-00272	2
8	NSI-MV-00119	2	48	NSI-MV-00052	4
9	NSI-MV-00402	2	49	NSI-MV-00023	8
10	NSI-MV-00106	3	50	NSI-MV-00309	2
11	NSI-MV-00124	2	51	NSI-MV-00022	9
12	NSI-MV-00122	5	52	NSI-MV-00013	3
13	NSI-MV-00107	2	53	NSI-MV-00180	2
14	NSI-MV-00095	2	54	NSI-MV-00003	2
15	NSI-MV-00094	4	55	NSI-MV-00011	3
16	NSI-MV-00099	15	56	NSI-MV-00036	2
17	NSI-MV-00155	2	57	NSI-MV-00033	6
18	NSI-MV-00098	2	58	NSI-MV-00183	4
19	NSI-MV-00241	2	59	NSI-MV-00215	2
20	NSI-MV-00142	4	60	NSI-MV-00054	3
21	NSI-MV-00199	2	61	NSI-MV-00074	2
22	NSI-MV-00259	2	62	NSI-MV-00079	2
23	NSI-MV-00205	6	63	NSI-MV-00082	4
24	NSI-MV-00193	2	64	NSI-MV-00236	3
25	NSI-MV-00322	2	65	NSI-MV-00212	2
26	NSI-MV-00244	2	66	NSI-MV-00301	2
27	NSI-MV-00186	4	67	NSI-MV-00156	2
28	NSI-MV-00091	3	68	NSI-MV-00061	3
29	NSI-MV-00239	2	69	NSI-MV-00060	4
30	NSI-MV-00208	2	70	NSI-MV-00177	3
31	NSI-MV-00088	11	71	NSI-MV-00297	2
32	NSI-MV-00045	6	72	NSI-MV-00178	5
33	NSI-MV-00029	4	73	NSI-MV-00250	2
34	NSI-MV-00006	7	74	NSI-MV-00086	2
35	NSI-MV-00065	6	75	NSI-MV-00170	2
36	NSI-MV-00049	6			
37	NSI-MV-00339	2			
38	NSI-MV-00056	2			
39	NSI-MV-00068	2			
40	NSI-MV-00053	6			



Slika 21: Dendrogram sorodnosti genetskih družin (n=75) 576 izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* dobljenih z metodo MIRU-VNTR/24. Za analizo podatkov smo uporabili program Bionumerics, dendrogram UPGMA in kategorični koeficient podobnosti.

Figure 21: MIRU-VNTR/24 method. Genetic clusters (n=75) analyzed with MIRU-VNTR/24 method from 576 *M. tuberculosis* complex isolates. Analysis was performed with Bionumerics program, UPGMA dendrogram and Categorical coefficient.



#### 4.4 PRIMERJAVA TREH RAZLIČNIH METOD TIPIZACIJE BACILOV IZ SKLOPA *M. tuberculosis*

Rezultati tipizacije z vsemi tremi metodami so pokazali, da sta si metodi RFLP in MIRU-VNTR/24 zelo podobni v razločevanju slovenskih izolatov in, da je njuna moč razlikovanja bacilov tuberkuloze prav tako zelo podobna. Največ genetskih družin je določila metoda RFLP (78), nekoliko manj MIRU-VNTR/24 (75). Velikost genetskih družin (število izolatov v posamezni genetski družini) je bila pri obeh metodah podobna (1-16 in 1-17), prav tako število izolatov v genetskih družinah (269, 272). Stopnja razvrščanja v genetske družine je bila z metodo RFLP za odstotek nižja kot z metodo MIRU-VNTR/24 (33,2 % ; 34,2 %). Koeficient po Hunter-Gastonu pa je pokazal, da je moč razlikovanja obeh metod enaka (Preglednica 12).

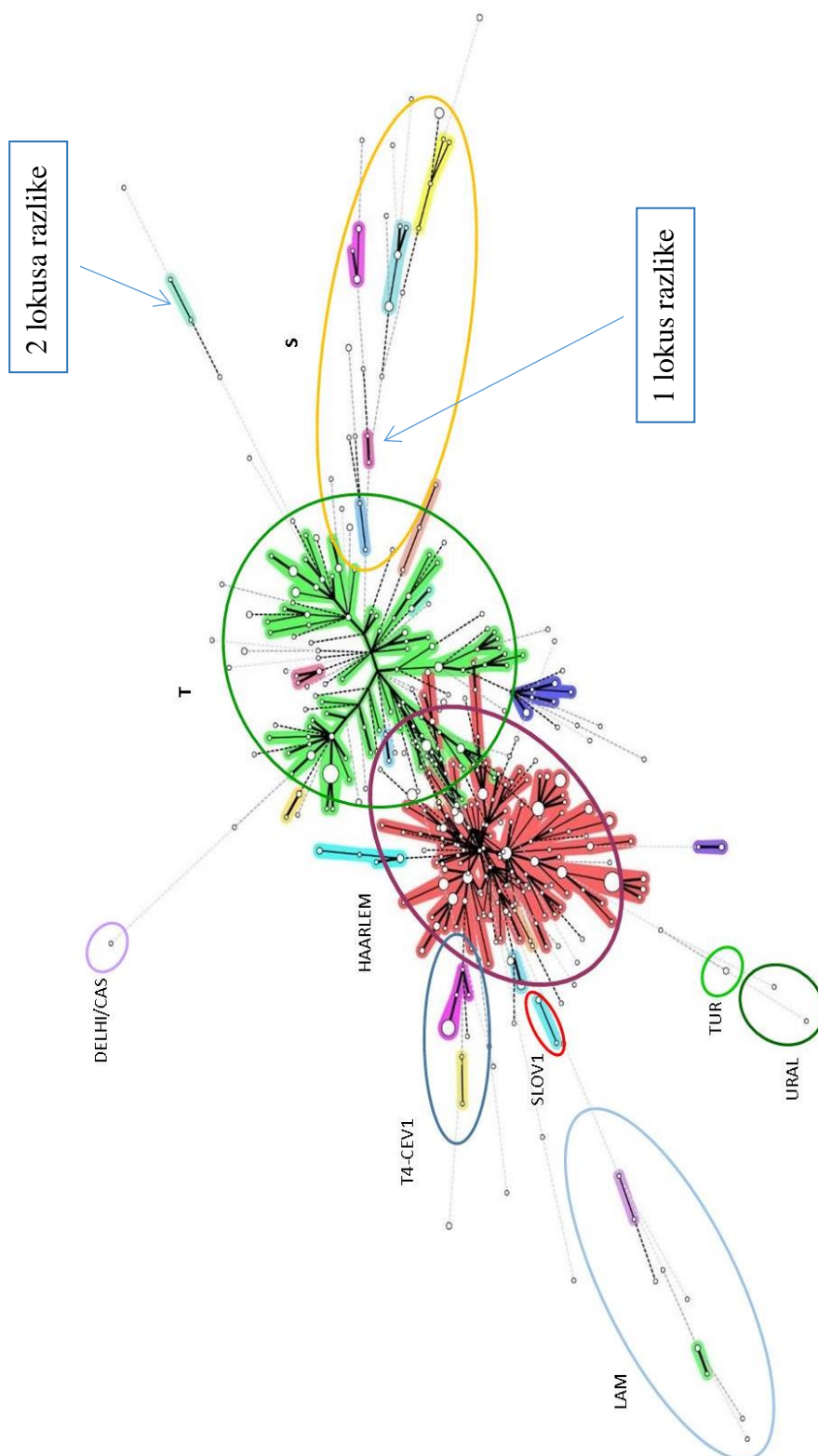
Metoda spoligotipizacije je po pričakovanjih pokazala veliko nižjo moč razlikovanja bacilov tuberkuloze. Njena največja genetska družina ima v tem časovnem obdobju treh let 108 izolatov, kar pomeni, da ima skoraj petina slovenskih izolatov enak genotip. V kolikor bi bilo število izolatov večje, bi se odstotek še povečal (Bidovec-Stojkovic in sod., 2011). Po podatkih epidemiološke službe so slovenski izolati precej bolj pestri, zato rezultati metode spoligotipizacije ne kažejo realnega stanja, kar nakazuje tudi nižji koeficient moči razlikovanja (HGDI = 0,89).

Filogenetsko sorodnost slovenskih izolatov analiziranih v naši triletni raziskavi prikazuje Slika 22. Razlike v trajanju izvedbe (čas do končnega rezultata) za posamezno tipizacijsko metodo je prikazana v Preglednici 11. Po pričakovanjih je najdaljši čas dosegla metoda RFLP (vsaj 3 tedne), veliko krajšega in realnega pa metodi na osnovi PCR, MIRU-VNTR (2 dni) in spoligotipizacija (3 dni).



Preglednica 12: Primerjava treh tipizacijskih metod na 576 slovenskih izolatih; RFLP, spoligotipizacija in MIRU-VNTR/24.  
Table 12: Analysis of three different genotyping methods on 576 Slovenian isolates; RFLP, spoligotyping and MIRU-VNTR/24.

<b>METODA TIPIZACIJE</b>	<b>Analiza v programu Bionumerics</b>	<b>Število genetskih družin</b>	<b>Število izolatov v posamezni genetski družini</b>	<b>Število izolatov v genetskih družinah (genetska raznolikost)</b>	<b>Število izolatov ki niso v genetskih družinah - unikatni genotipi</b>	<b>Število različnih genotipov</b>	<b>HGDI</b>	<b>Stopnja razvrščanja v genetske družine</b>
<b>RFLP IS6110</b>	Dice	78	2-16	269 (46,7 %)	307 (53,3 %)	385	0,9831	0,3315 (33,2 %)
<b>SPOLIGOTIPIZACIJA</b>	Kategorični koeficient	50	2-108	474 (82,3 %)	102 (17,7 %)	152	0,8942	0,7361 (73,6 %)
<b>MIRU-VNTR/24</b>	Kategorični koeficient	75	2-17	272 (47,2 %)	303 (52,8 %)	379	0,9824	0,3420 (34,2 %)
<b>MIRU-VNTR/24 in SPOLIGOTIPIZACIJA</b>	Kategorični koeficient	70	2-17	246 (42,7 %)	330 (57,3 %)	400	0,981	0,3055 (30,6 %)



Slika 22: Minimalno vpeto drevo 576 slovenskih izolatov, ki je osnovan na raznolikosti alelov dobljenih z metodo MIRU-VNTR/24 in nakazuje hipotetično filogenetsko sorodnost slovenskih izolatov. Razdalja med dvema skupinama je odvisna od alelne raznolikosti. Najkrajša razdalja in najmočnejša jakost črte predstavlja razliko enega alela. Z temno rdečo barvo je označena genetska linija Haarlem, z zeleno linija T, z rumenim obročem linija S, s temnomodrim obročem T4-CEV1, s svetlomodrim obročem LAM in z rdečim obročem SLOV1.

Figure 22: Minimum spanning tree of 576 Slovenian isolates based on the allele diversity determined by MIRU-VNTR/24 analysis. Distance between two nodes and intensity of the line correspond with allele differences. Dark red ellipse is showing Haarlem lineage, green T lineage, yellow S lineage, dark blue T4-CEV1 lineage, light blue LAM lineage and red SLOV1 lineage.

Epidemiološke podatke smo pridobili iz Registra za tuberkulozo Golnik. Vodja epidemiološkega oddelka in glavna medicinska sestra sta pregledali podatke o pacientih, ki so zajeti v našo raziskavo. Glede na najdene epidemiološke povezave sta razporedili bolnike s tuberkulozo v epidemiološke skupine, ki sta jim dodali podatke o genetskih družinah dobljenih z metodo MIRU-VNTR/24. Rezultatom naših metod smo dodali njune epidemiološke ugotovitve in podrobneje pogledali ujemanje med epidemiologijo in rezultati metod. Za osnovno analizo smo upoštevali genetske družine določene z metodo MIRU-VNTR/24, ki smo jim dodali še rezultate obeh metod tipizacije in epidemiološke podatke.

Metodološki rezultati so pokazali 100-odstotno ujemanje med metodo MIRU-VNTR/24 in RFLP pri 44 od skupno 75 (58,7 %) genetskih družinah. Metoda spoligotipizacije je s 5-imi spoligotipi še povečala ujemanje zgoraj omenjenih dveh metod na 65,3 odstotkov (49 genetskih družin ima 100 odstotno metodološko ujemanje).

Epidemiološko ovrednotenih je bilo znotraj skupno 75 genetskih družin, ki smo jih določili z metodo MIRU-VNTR/24, 23 (31 %) genetskih družin s skupno 131 izolati (Preglednica 10 in 13, Slika 23). Ujemanje med metodološkimi in epidemiološkimi rezultati je znašalo med 25 in 100 odstotki (Preglednica 15). Popolno ujemanje vseh treh metod smo ugotovili pri 16/23 (69,6 %) epidemiološko povezanih genetskih družinah z oznako: NSI-MV-00129, NSI-MV-00133, NSI-MV-00328, NSI-MV-00106, NSI-MV-00205, NSI-MV-00091, NSI-MV-00088, NSI-MV-00031, NSI-MV-00052, NSI-MV-00023, NSI-MV-00033, NSI-MV-00236, NSI-MV-00212, NSI-MV-00060, NSI-MV-00178 in NSI-MV-00170.

Pri ostalih 7 (30,4 %) epidemiološko povezanih genetskih družinah ni bilo popolnega ujemanja med rezultati pridobljenimi z različnimi metodami, vendar se njihovi rezultati, kljub različnosti ujemajo s podatki epidemiologije. To pomeni, da smo epidemiološko povezane bolnike uspeli povezati tudi s tipizacijskimi metodami MIRU-VNTR/24, RFLP in metodo spoligotipizacije. Genetske družine v tej skupini imajo oznake: NSI-MV-00094, NSI-MV-00099, NSI-MV-00006, NSI-MV-00049, NSI-MV-00053, NSI-MV-00027 in

NSI-MV-00032. Te družine si bomo v nadaljnjih poglavjih še podrobneje ogledali (Preglednica 14).

Podrobnejšo analizo smo naredili še pri treh genetskih družinah, ki epidemiološko niso povezane. Njihova posebnost je v tem, da združeni rezultati metode MIRU-VNTR/24 in spoligotipizacije ponudijo enako tipizacijsko sliko kot jo prikaže metoda RFLP. To so družine NSI-MV-00029, NSI-MV-00239 in NSI-MV-00309 (Slike 32-34).

Največkrat opažene epidemiološke povezave, ki so jih pri svojem delu odkrili na oddelku za epidemiologijo so bile sorodstvene vezi (oče/mama/hči), daljni sorodniki, prijatelji, gradbeni delavci (zaposleni v istem gradbenem podjetju), delavci iz BIH, sostanovalci, brezdomci v zavetišču, gostinski lokali (alkoholizem)...

Bolniki, ki smo jih uspeli epidemiološko povezati so bili prepoznani v enakih genetskih družinah tako z metodo MIRU-VNTR/24, kot tudi z metodo RFLP.

Preglednica 13: Razdelitev genetskih družin določenih z metodo MIRU-VNTR/24. V prvem stolpcu so navedene vse genetske družine določene z metodo MIRU-VNTR/24 s pripadajočimi oznakami in številom izolatov v posamezni družini. V drugih dveh stolpcih so ločene epidemiološko povezane od epidemiološko nepovezanih genetskih družin s pripadajočimi oznakami in številom izolatov v posamezni družini.

Table 13: Clusters defined with MIRU-VNTR/24 method. First column are all clusters with their designations and number of isolates in each cluster. In the other two columns are clusters divided in epidemiologically linked and epidemiologically not linked also with their corresponded designations and number of isolates per cluster.

EPIDEMIOLOŠKO POVEZANE GENETSKE DRUŽINE		GENETSKE DRUŽINE BREZ EPIDEMIOLOŠKE POVEZAVE	
Število izolatov v genetski družini	Oznaka genetske družine (MIRU-VNTR)	Število izolatov v genetski družini	Oznaka genetske družine (MIRU-VNTR)
2	NSI-MV-00129	3	NSI-MV-00146
7	NSI-MV-00133	2	NSI-MV-00114
2	NSI-MV-00328	2	NSI-MV-00117
3	NSI-MV-00106	3	NSI-MV-00120
4	NSI-MV-00094	2	NSI-MV-00119
15	NSI-MV-00099	2	NSI-MV-00402
6	NSI-MV-00205	2	NSI-MV-00124
3	NSI-MV-00091	5	NSI-MV-00122
11	NSI-MV-00088	2	NSI-MV-00107
7	NSI-MV-00006	2	NSI-MV-00095
6	NSI-MV-00049	2	NSI-MV-00155
6	NSI-MV-00053	2	NSI-MV-00098
6	NSI-MV-00027	2	NSI-MV-00241
2	NSI-MV-00031	4	NSI-MV-00142
17	NSI-MV-00032	2	NSI-MV-00199
4	NSI-MV-00052	2	NSI-MV-00259
8	NSI-MV-00023	2	NSI-MV-00193
6	NSI-MV-00033	2	NSI-MV-00322
3	NSI-MV-00236	2	NSI-MV-00244
2	NSI-MV-00212	4	NSI-MV-00186
4	NSI-MV-00060	2	NSI-MV-00239
5	NSI-MV-00178	2	NSI-MV-00208
2	NSI-MV-00170	6	NSI-MV-00045
		4	NSI-MV-00029
		6	NSI-MV-00065
		2	NSI-MV-00339
		2	NSI-MV-00056
		2	NSI-MV-00068
		3	NSI-MV-00001
		2	NSI-MV-00050
		3	NSI-MV-00048
		2	NSI-MV-00272
		2	NSI-MV-00309
		9	NSI-MV-00022
		3	NSI-MV-00013
		2	NSI-MV-00180
		2	NSI-MV-00003
		3	NSI-MV-00011
		2	NSI-MV-00036
		4	NSI-MV-00183
		2	NSI-MV-00215
		3	NSI-MV-00054
		2	NSI-MV-00074
		2	NSI-MV-00079
		4	NSI-MV-00082
		2	NSI-MV-00301
		2	NSI-MV-00156
		3	NSI-MV-00061
		3	NSI-MV-00177
		2	NSI-MV-00297
		2	NSI-MV-00250
		2	NSI-MV-00086

Preglednica 14: Natančnejša analiza epidemiološko povezanih genetskih družin (obarvano oranžno) in ujemanje treh tipizacijskih metod (MIRU-VNTR/24, spoligotipizacija, RFLP).

Table 14: Epidemiologically linked clusters. Detailed analysis of data for all three methods (MIRU-VNTR/24, spoligotyping, RFLP).

Zaporedna številka genetske družine	Število izolatov v genetski družini / število epidemiološko povezanih izolatov	Oznaka genetske družine (MIRU-VNTR)	Primerjava genetskih družin MIRU-VNTR/24 z metodama spoligotipizacije in RFLP <u>Število genotipov v genetski družini opredeljenih s posamezno metodo / oznaka svetovne spoligolinije</u>			Epidemiološka povezanost
			SPOLIGO / svetovna linija	RFLP	MIRU + SPOLIGO	
1	3	NSI-MV-00146	3	3	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
2	2/2	NSI-MV-00129	2 / T	2	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gostinski lokal
3	7/2	NSI-MV-00133	7 / T	7	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sosetje
4	2/2	NSI-MV-00328	2 / T	2	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gostinski lokal
5	2	NSI-MV-00114	2	različen: F3139 ima 9 pasov, F2833 ima 8 pasov	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
6	2	NSI-MV-00117	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
7	3	NSI-MV-00120	3	3	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
8	2	NSI-MV-00119	različen	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
9	2	NSI-MV-00402	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
10	3/3	NSI-MV-00106	3 / T	3	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - brezdomci, obala
11	2	NSI-MV-00124	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
12	5	NSI-MV-00122	5	4x enak, F3252 ima 1 pas več - drugačen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
13	2	NSI-MV-00107	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
14	2	NSI-MV-00095	različen	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
15	4/2	NSI-MV-00094	3x enak genotip, 1 različen (F2843) / T	3x enak genotip, 1 različen (F2843)	METODOLOŠKO MIRU+SPOL=RFLP	Epidemiološka povezava – sorodstvene vezi
16	15/12	NSI-MV-00099	15 / T	12 x enak, 3x različen genotip (F3236, F2849, F3153)	Ni relevantno	Epidemiološka povezava – sorodstvene vezi, sodelavci, gostinski lokal
17	2	NSI-MV-00155	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
18	2	NSI-MV-00098	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
19	2	NSI-MV-00241	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
20	4	NSI-MV-00142	3x enak, 1 različen (F3138)	2x enak, 1 različen (F3138), 1 različen (F3398)	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
21	2	NSI-MV-00199	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
22	2	NSI-MV-00259	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
23	6/4	NSI-MV-00205	6 / T	6	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gostinski lokal, alkoholizem
24	2	NSI-MV-00193	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
25	2	NSI-MV-00322	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
26	2	NSI-MV-00244	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
27	4	NSI-MV-00186	4	4	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
28	3/3	NSI-MV-00091	3 / T	3	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gostinski lokal
29	2	NSI-MV-00239	različen	različen	METODOLOŠKO MIRU+SPOL=RFLP	ni epidemiološke povezave
30	2	NSI-MV-00208	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
31	11/9	NSI-MV-00088	11 / T4-CEU1	11	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gostinski lokal, sosetje
32	6	NSI-MV-00045	4 različni genotipi	5 različnih genotipov	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
33	4	NSI-MV-00029	3 različni genotipi	3 različni genotipi	METODOLOŠKO MIRU+SPOL=RFLP	ni epidemiološke povezave

Se nadaljuje



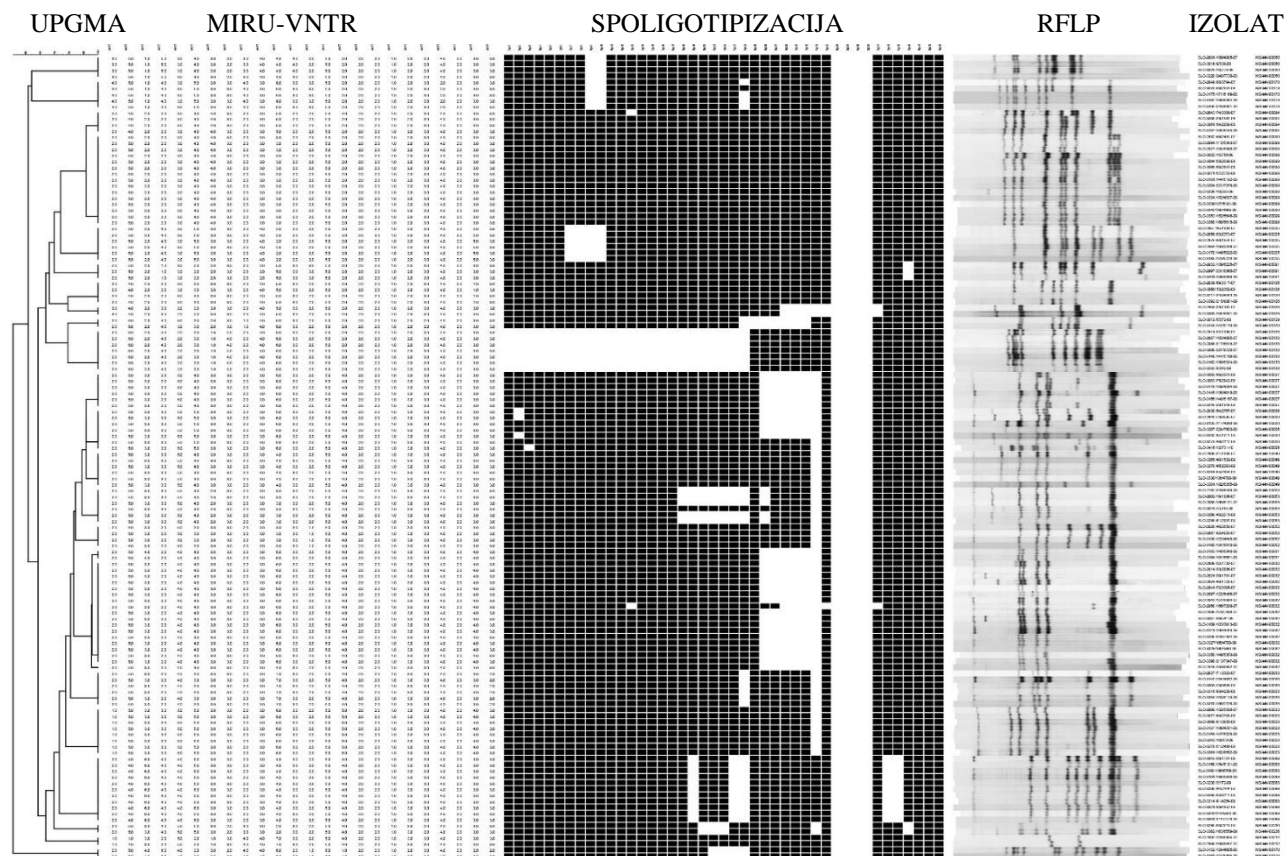
Nadaljevanje preglednice 14: Natančnejša analiza epidemiološko povezanih genetskih družin (obarvano oranžno) in ujemanje treh tipizacijskih metod (MIRU-VNTR/24, spoligotipizacija, RFLP).  
Continuing table 14: Epidemiologically linked clusters. Detailed analysis of data for all three methods (MIRU-VNTR/24, spoligotyping, RFLP).

Zaporedna številka genetske družine	Število izolatov v genetski družini / število epidemiološko povezanih izolatov	Oznaka genetske družine (MIRU-VNTR)	Primerjava genetskih družin MIRU-VNTR/24 z metodama spoligotipizacije in RFLP			Epidemiološka povezanost
			Število genotipov v genetski družini opredeljenih s posamezno metodo / oznaka svetovne spoligolinije			
			SPOLIGO / svetovna linija	RFLP	MIRU + SPOLIGO	
34	7/3+1	NSI-MV-00006	4 različni genotipi; enak genotip F2846/F2830/F3262 drugačen F3273, drugačen F3207/F3125, drugačen F3416 / H	5 različnih genotipov; enak F2846/F2830/F3262, ostali vsak zase drugačen	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gostinski lokal
35	6	NSI-MV-00065	3 različni genotipi; enak F2968/F2890/F3157 /F3017, drugačen F2791, drugačen F3131	3 različni genotipi; drugačna grupacija, enak genotip F2968/F2890/F3157, drugačen F2791/F3017, drugačen F3131	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
36	6/4	NSI-MV-00049	6 / H	5 x enak genotip, različen F3381	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gradbeni delavci
37	2	NSI-MV-00339	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
38	2	NSI-MV-00056	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
39	2	NSI-MV-00068	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
40	6/6	NSI-MV-00053	2 različna genotipa, 5x enak, 1x drugačen genotip F3021 / H	2 različna genotipa, 5x enak, 1x drugačen genotip F3021	<b>METODOLOŠKO MIRU+SPOL=RFLP</b>	Epidemiološka povezava - gradbeni delavci (prihajajo iz BiH)
41	3	NSI-MV-00001	3	3	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
42	6/3	NSI-MV-00027	6 / H	4 različni genotipi, enak genotip F3116/F3249/F3083, različen F3145, različen F3155, različen F3062	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - gradbeni delavci
43	2	NSI-MV-00050	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
44	3	NSI-MV-00048	3	2x enak, 1x različen F3039	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
45	2/2	NSI-MV-00031	2 / H	2	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sorodstvene vezi, prijatelji
46	18/2+1	NSI-MV-00032	17 x enak genotip, 1x drugačen F2958 / H	10x enak genotip, drugačen F2821/F2948/F3037, drugačen F2897, drugačen F2958, drugačen F2824, drugačen F2808, drugačen F3350	genotip, ki ga ima 10 RFLP izolatov ima še 3 izolati, ki so le 1 lokus razlike z GS NSI-MV-00032 (F3153/F3194/F3229)	Epidemiološka povezava - sorodstvene vezi
47	2	NSI-MV-00272	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
48	4/3	NSI-MV-00052	4 / H	4	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sorodstvene vezi
49	8/2	NSI-MV-00023	8 / H	8	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - zavetišče
50	2	NSI-MV-00309	različen	različen	<b>METODOLOŠKO MIRU+SPOL=RFLP</b>	ni epidemiološke povezave
51	9	NSI-MV-00022	8x enak genotip, različen F2785	7x enak genotip, drugačen F3070, različen F2785	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
52	3	NSI-MV-00013	3	3	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
53	2	NSI-MV-00180	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
54	2	NSI-MV-00003	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
55	3	NSI-MV-00011	3	2x enak genotip, različen F3049	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
56	2	NSI-MV-00036	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
57	6/3	NSI-MV-00033	6 / H	6	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sorodstvene vezi

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 14: Natančnejša analiza epidemiološko povezanih genetskih družin (obarvano oranžno) in ujemanje treh tipizacijskih metod (MIRU-VNTR/24, spoligotipizacija, RFLP).  
Continuing table 14: Epidemiologically linked clusters. Detailed analysis of data for all three methods (MIRU-VNTR/24, spoligotyping, RFLP).

Zaporedna številka genetske družine	Število izolatov v genetski družini / število epidemiološko povezanih izolatov	Oznaka genetske družine (MIRU-VNTR)	Primerjava genetskih družin MIRU-VNTR/24 z metodama spoligotipizacije in RFLP <u>Število genotipov v genetski družini opredeljenih s posamezno metodo / oznaka svetovne spoligolinije</u>			Epidemiološka povezanost
			SPOLIGO / svetovna linija	RFLP	MIRU + SPOLIGO	
58	4	NSI-MV-00183	4	4	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
59	2	NSI-MV-00215	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
60	3	NSI-MV-00054	3	2x enak genotip F3104/F3300, različen F3161	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
61	2	NSI-MV-00074	različen	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
62	2	NSI-MV-00079	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
63	4	NSI-MV-00082	4	4	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
64	3/2	NSI-MV-00236	3 / HAARLEM	3	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sorodstvene vezi
65	2/2	NSI-MV-00212	2 / TUR	2	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sorodstvene vezi
66	2	NSI-MV-00301	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
67	2	NSI-MV-00156	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
68	3	NSI-MV-00061	3	3	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
69	4/2	NSI-MV-00060	4 / S	4	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sosedje
70	3	NSI-MV-00177	3	2x enak genotip F2896/F2933, drugačen F3088	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
71	2	NSI-MV-00297	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
72	5/2	NSI-MV-00178	5 / S	5	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sodelavci (smetarji)
73	2	NSI-MV-00250	2	2	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
74	2	NSI-MV-00086	2	različen	Ni relevantno	ni epidemiološke povezave
75	2/2	NSI-MV-00170	2 / LAM	2	Ni relevantno	Epidemiološka povezava - sodelavci, sosoanovanci



Slika 23: Ujemanje vseh treh tipizacijskih metod (MIRU-VNTR/24, spoligotipizacija, RFLP IS6110) pri 131 izolatih in 23 epidemiološko povezanih genetskih družinah. Dendrogram UPGMA je bil narejen na metodi MIRU-VNTR/24.

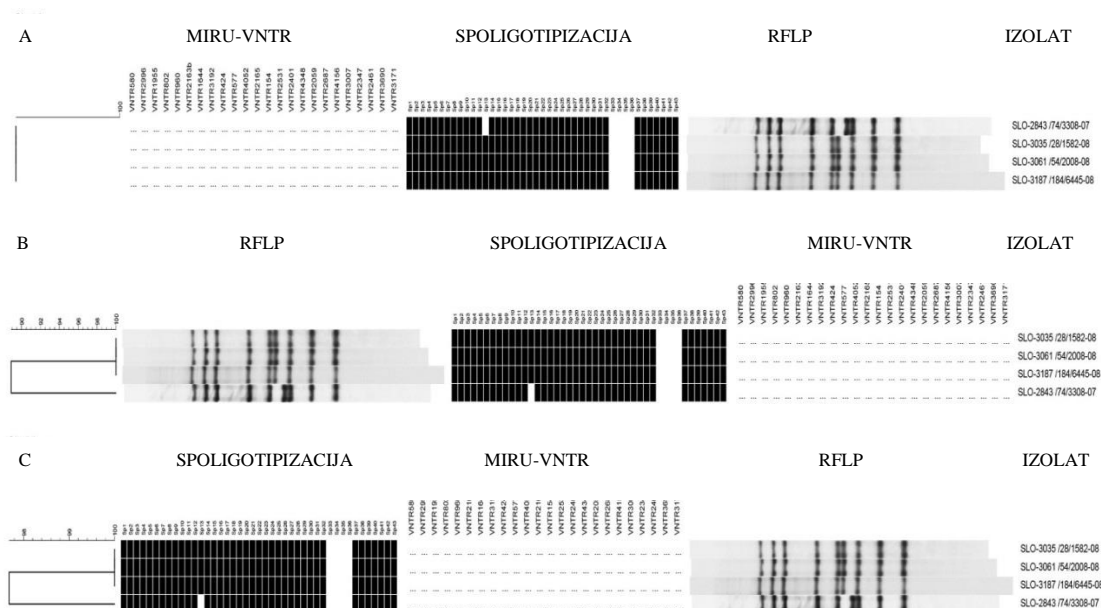
Figure 23: Analysis of three typing methods (MIRU-VNTR/24, spoligotyping, RFLP IS6110) among 131 isolates in 23 epidemiologically linked clusters.

Preglednica 15: Podrobnejša statistična analiza epidemiološko povezanih genetskih družin.  
 Table 15: Detailed statistical analysis of epidemiologically linked clusters.

Oznaka genetske družine (MIRU-VNTR)	Število izolatov v genetski družini	Ujemanje metod MIRU-VNTR / SPOLIGO (%)	Ujemanje metod MIRU-VNTR / RFLP (%)	Ujemanje metod MIRU-VNTR / RFLP / SPOLIGO (%)	MIRU-VNTR+SPOL = RFLP
NSI-MV-00129	2	100	100	100	/
NSI-MV-00133	7	100	100	100	/
NSI-MV-00328	2	100	100	100	/
NSI-MV-00106	3	100	100	100	/
NSI-MV-00094	4	3/4 (75 %)	3/4 (75 %)	3/4 (75 %)	DA
NSI-MV-00099	15	100	12/15 (80 %)	12/15 (80 %)	/
NSI-MV-00205	6	100	100	100	/
NSI-MV-00091	3	100	100	100	/
NSI-MV-00088	11	100	100	100	/
NSI-MV-00006	7	3/7 (43 %)	3/7 (43 %)	3/7 (43 %)	/
NSI-MV-00049	6	100	5/6 (83 %)	5/6 (83 %)	/
NSI-MV-00053	6	5/6 (83 %)	5/6 (83 %)	5/6 (83 %)	DA
NSI-MV-00027	6	100	3/6 (50 %)	3/6 (50 %)	/
NSI-MV-00031	2	100	100	100	/
NSI-MV-00032	17	16/17 (94 %)	11/17 (65 %)	11/17 (65 %)	/
NSI-MV-00052	4	100	100	100	/
NSI-MV-00023	8	100	100	100	/
NSI-MV-00033	6	100	100	100	/
NSI-MV-00236	3	100	100	100	/
NSI-MV-00212	2	100	100	100	/
NSI-MV-00060	4	100	100	100	/
NSI-MV-00178	5	100	100	100	/
NSI-MV-00170	2	100	100	100	/
		<b>100 %: 19/23 (83 %)</b> <b>80-100 %: 21/23 (91 %)</b>	<b>100 % : 16/23 (70 %)</b> <b>80-100 %: 19/23 (83 %)</b>	<b>100 % : 16/23 (70 %)</b> <b>80-100 %: 19/23 (83 %)</b>	

## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00094

Je epidemiološko povezana. Povezana sta 2 izolata dveh bolnikov (F3035 in F3061). Med bolnikoma obstaja sorodstvena vez (oče, hči). Vse tri metode povežejo oba izolata v genetsko družino. Za preostala 2 izolata drugih dveh bolnikov, ki so jih tipizacijske metode razporedile v isto genetsko družino, nismo našli dejavnikov, ki bi jih epidemiološko povezali (Slika 24).



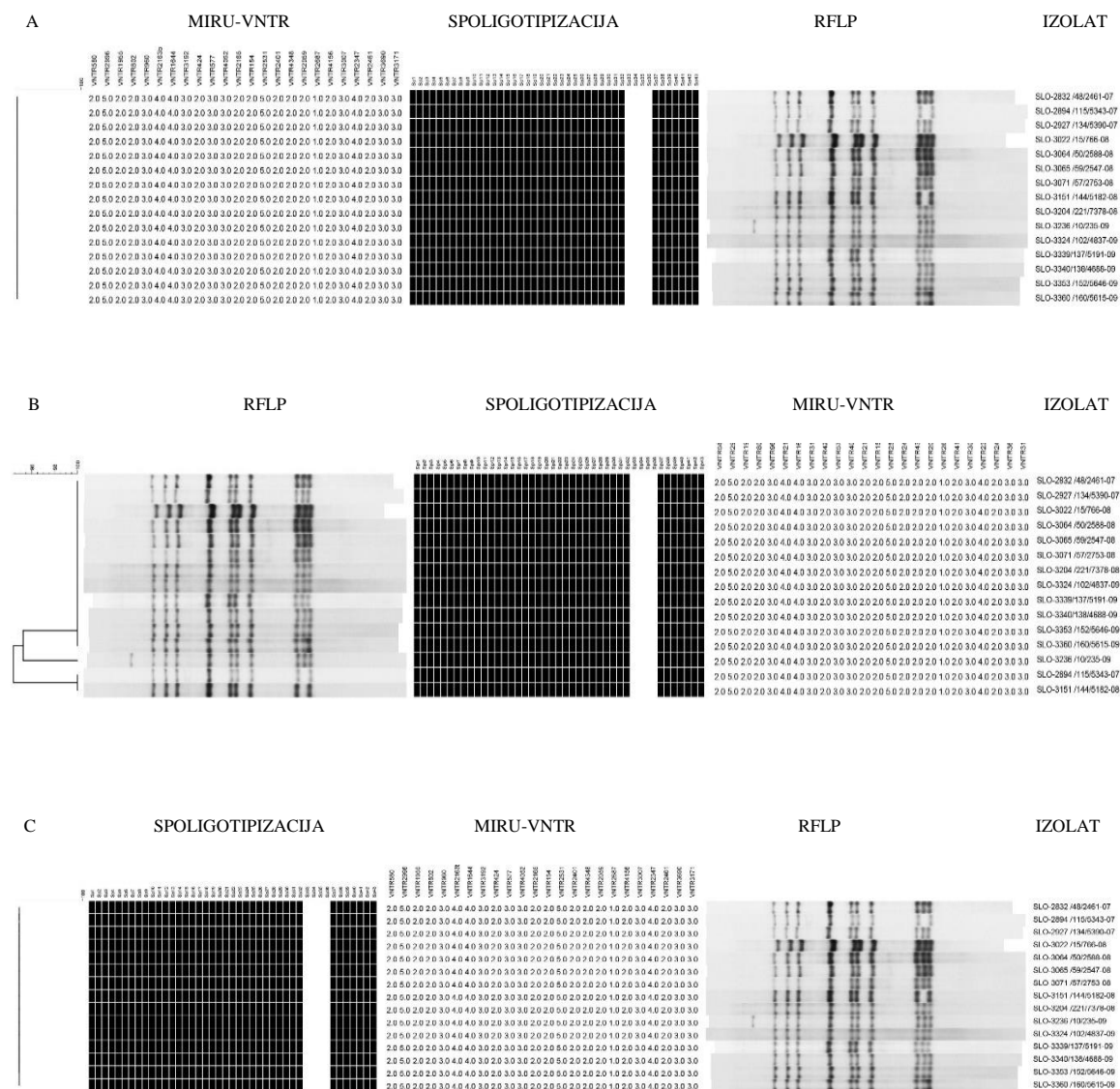
Slika 24: Genetska družina NSI-MV-00094 obsega 4 izolate. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP IS 6110. Dva izolata sta epidemiološko povezana. Ustrezno ju povežejo vse tri metode. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati MIRU-VNTR in Spoligotipizacije le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 24: Cluster NSI-MV-00094. Spoligotyping together with MIRU-VNTR/24 resolves the same genotyping result as RFLP method. Epidemiological link was found for two isolates. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

### GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00099

Je epidemiološko povezana. Znotraj velike genetske družine (Slika 25) smo našli štiri manjše epidemiološko povezane skupine. Prva skupina zajema 4 izolate treh bolnikov (F2832, F3022, F3064 in F3065). Med njimi so dokazane sorodstvene vezi in vsi so zaposleni v istem gradbenem podjetju. Druga epidemiološko povezana skupina znotraj omenjene genetske družine so 3 izolati treh bolnikov (F3360, F3324 in F3353). Med njimi so dokazane sorodstvene vezi (oče, mati, otrok). Tretjo epidemiološko povezano skupino tvorijo 3 izolati treh bolnikov (F3340, F3339 in F3071) za katere so epidemiološki podatki pokazali, da so zahajali v isti gostinski lokal. Četrta epidemiološko povezana skupina zajema 2 izolata dveh bolnikov (F2894 in F3151). Dokazana jim je bila epidemiološka povezanost saj sta oba gradbena delavca istega gradbenega podjetja in oba prihajata iz BIH. Preostali trije izolati treh bolnikov imajo enak MIRU-VNTR genotip, vendar pri njih nismo našli nobene epidemiološke povezave.

Metoda MIRU-VNTR/24 in spoligotipizacija vse štiri skupine povežeta v eno veliko genetsko družino. Metoda RFLP pa prve tri skupine poveže skupaj, zadnjo četrto skupino pa loči v svojo genetsko družino. Med omenjenimi štirimi skupinami nismo našli epidemiološke povezave, ki bi jih povezala v skupno celoto, so pa vsi prebivalci mesta Koper (Slika 25).

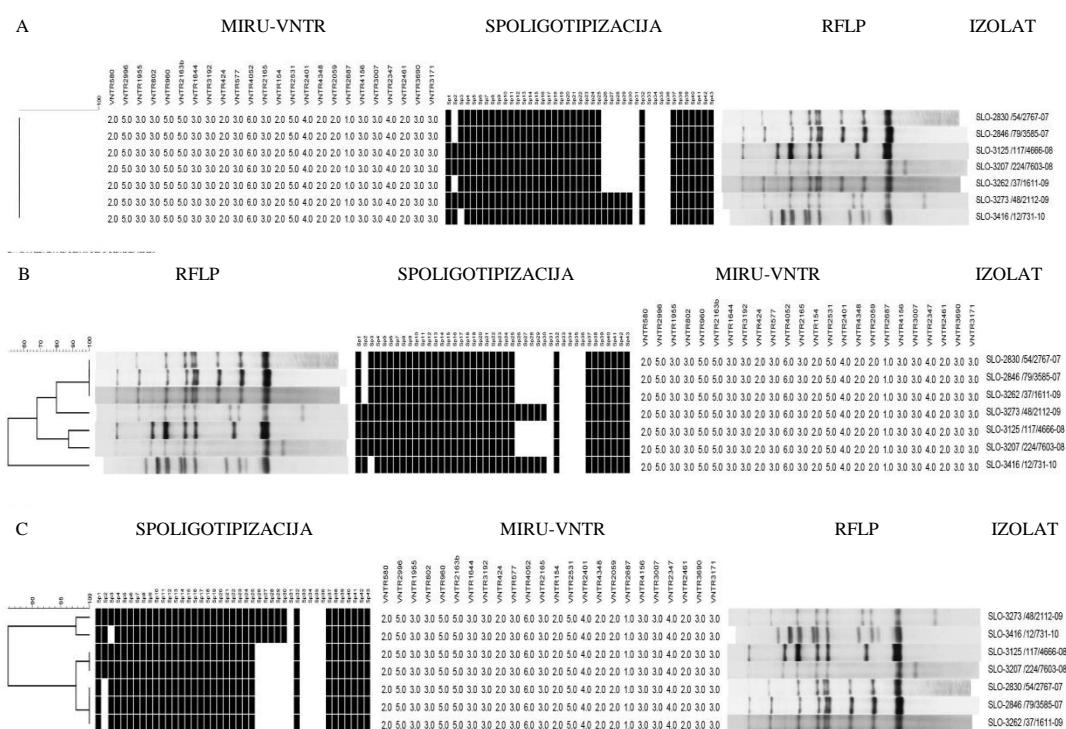


Slika 25: Genetska družina NSI-MV-00099. Rezultati spoligotipizacije so enaki rezultatu metode MIRU-VNTR/24, vsi imajo enak genotip. Metoda RFLP razdeli izolate v 12 enakih in 3, ki se razlikujejo od prvih 12. Epidemiološko povezani so vsi znotraj skupine 12 genotipov. Preostali trije izolati imajo enak MIRU-VNTR genotip, vendar pri njih nismo našli nobene epidemiološke povezave. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 25: Cluster NSI-MV-00099. Spoligotyping and MIRU-VNTR/24 have the same genotyping result. RFLP method has divided strains into three groups. First with 12 genotypes and 3 different from first 12. Epidemiologically linked strains are among 12 genotypes and are reflecting the same epidemiological situation as the other two methods. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00006

Je epidemiološko povezana genetska družina s sedmimi izolati (Slika 26). Epidemiološki podatki so uspeli povezati le štiri izolate štirih bolnikov (F2846, F2830, F3262 in F3293). Z metodo MIRU-VNTR/24 so povezani le trije izolati (F2846, F2830 in F3262). Četrty (F3293) ima en lokus razlike, zato spada v drugo genetsko družino (NSI-MV-228) vendar, ker je epidemiološko dokazana povezanost, ga lahko uvrstimo v GD NSI-MV-00006. Vsi zahajajo v isti gostinski lokal, kjer se družijo. Metoda RFLP in spoligotipizacija vse štiri izolate povežeta v enotno genetsko družino (Slika 26).



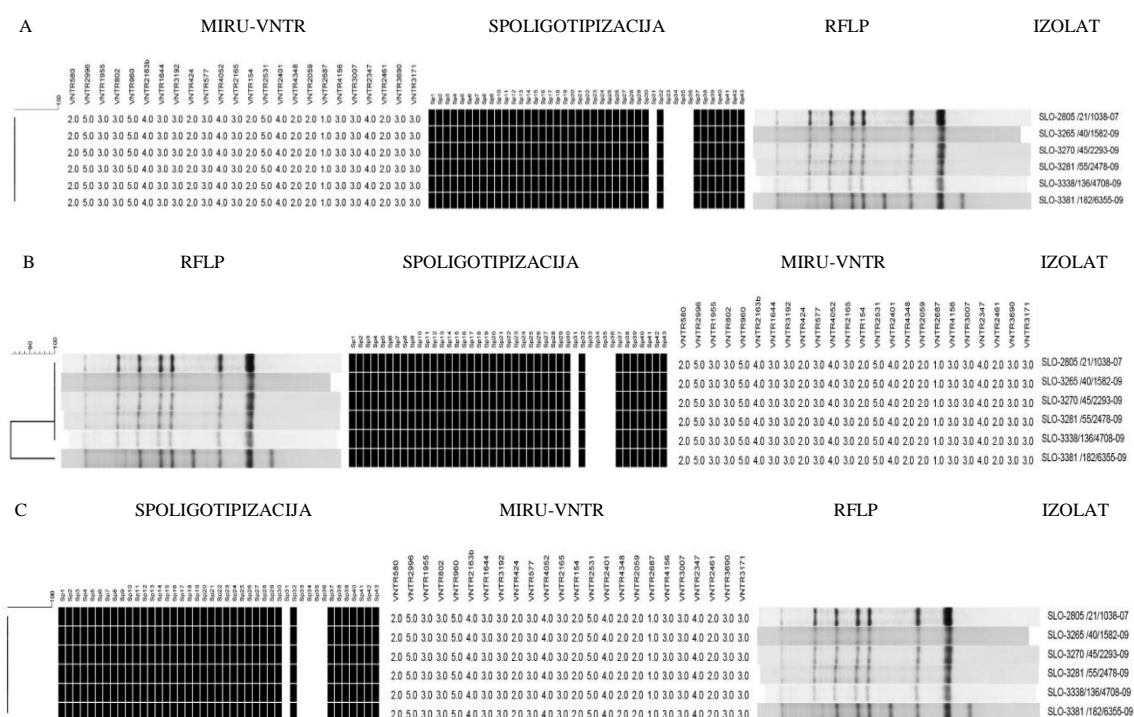
Slika 26: Genetska družina NSI-MV-00006. Rezultat spoligotipizacije so štiri različni genotipi v primerjavi z metode MIRU-VNTR/24. Metoda RFLP razdeli izolate v pet različnih genotipov. Izolati, ki so epidemiološko povezani (F2846, F2830 in F3262) so z vsemi metodami povezani v genetsko družino. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 26: Cluster NSI-MV-00006. Spoligotyping method revealed four different genotypes in comparison to MIRU-VNTR/24. RFLP method has divided strains into five groups. Epidemiologically linked isolates are with all three methods linked in the same cluster. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.



## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00049

Je epidemiološko povezana (Slika 27). Epidemiološko so povezani 4 izolati 4 bolnikov (F3270, F3281, F3338 in F3265) izmed skupno 6 izolatov. Za preostala 2 izolata 2 bolnikov nismo našli epidemiološke povezave. Vsi 4 bolniki, ki so epidemiološko povezani so gradbeni delavci pri istem gradbenem podjetju. Vse tri metode jih enako povežejo v skupno genetsko družino (Slika 27).

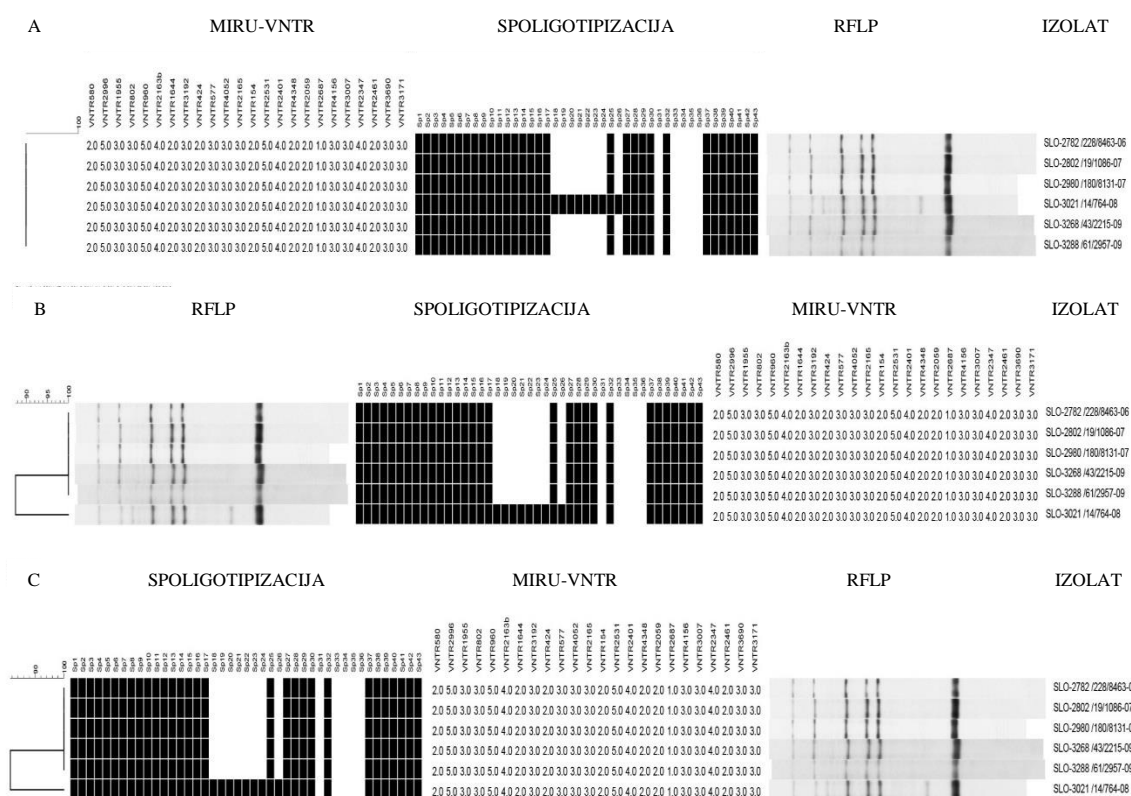


Slika 27: Genetska družina NSI-MV-00049. Rezultat spoligotipizacije je enak v primerjavi z metodo MIRU-VNTR/24. Metoda RFLP razdeli izolate v dve skupini. Prva s petimi izolati, ki imajo enak genotip in druga z enim izolatom, ki se razlikuje od ostalih. Izolati, ki so epidemiološko povezani (F3270, F3281 in F3338) so z vsemi metodami povezani v genetsko družino. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 27: Cluster NSI-MV-00049. Spoligotyping method revealed the same genotyping pattern as MIRU-VNTR/24. RFLP method has divided strains into two groups. Epidemiologically linked isolates are with all three methods linked in clusters. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00053

Je epidemiološko povezana (Slika 28). Vseh 6 izolatov 6 bolnikov, ki predstavljajo genetsko družino metoda MIRU-VNTR/24 poveže v eno genetsko družino. Z metodama RFLP in spoligotipizacija smo uspeli povezati le 5 od 6 izolatov. V obeh primerih izolat F3021 pokaže zelo drugačen genotip (RFLP - razlika v 2 pasovih, spoligotipizacija – razlika v 8 oligonukleotidih). Vseh 6 bolnikov je epidemiološko povezanih. So gradbeni delavci, istega gradbenega podjetja in vsi prihajajo iz BIH.

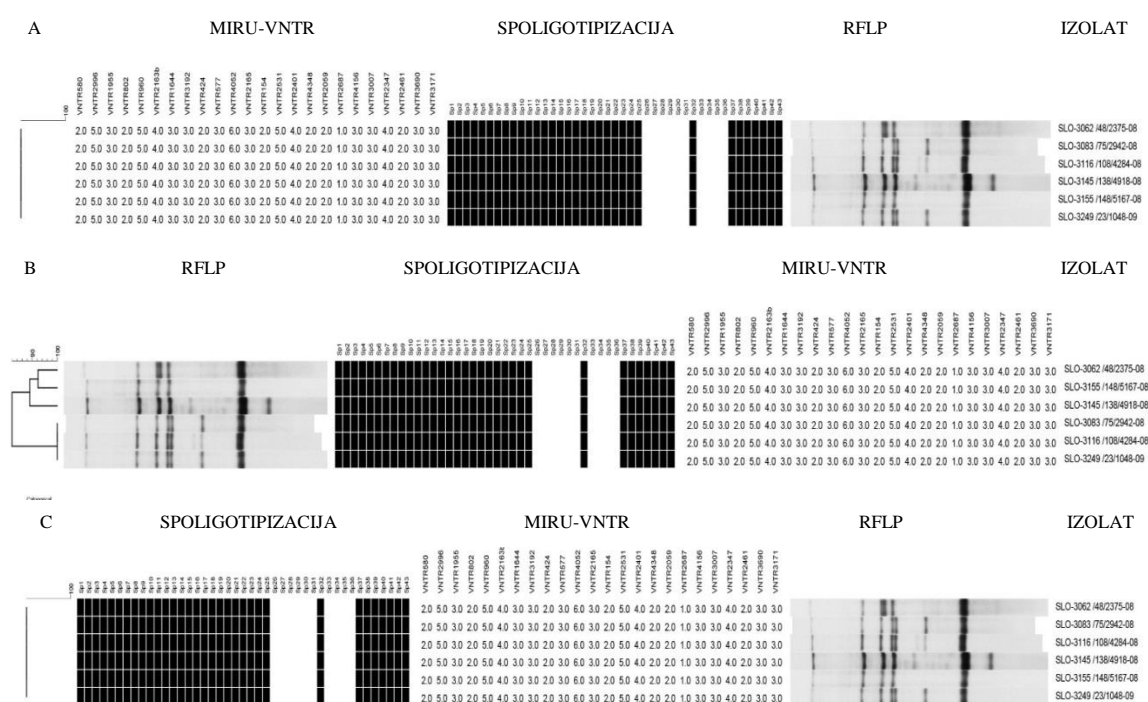


Slika 28: Genetska družina NSI-MV-00053 je epidemiološko povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Vseh 6 izolatov je epidemiološko povezanih. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 28: Cluster NSI-MV-00053 is epidemiologically linked. Spoligotyping together with MIRU-VNTR/24 resolves the same genotyping result as RFLP method. All isolates (6) are epidemiologically linked. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00027

Je epidemiološko povezana. Izmed 6 izolatov 6 bolnikov so epidemiološko povezani le trije (F3116, F3249 in F3083). Vsi trije bolniki so epidemiološko povezani kot gradbeni delavci. Vse tri metode jih enako povežejo v skupno genetsko družino (Slika 29). Preostale 3 izolate 3 bolnikov nismo uspeli epidemiološko povezati



Slika 29: Genetska družina NSI-MV-00027. Rezultat spoligotipizacije je enak v primerjavi z metodo MIRU-VNTR/24. Metoda RFLP razdeli izolate v štiri različne genotipe. Izolati, ki so epidemiološko povezani (F3116, F3249 in F3083) so z vsemi metodami povezani v genetsko družino. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

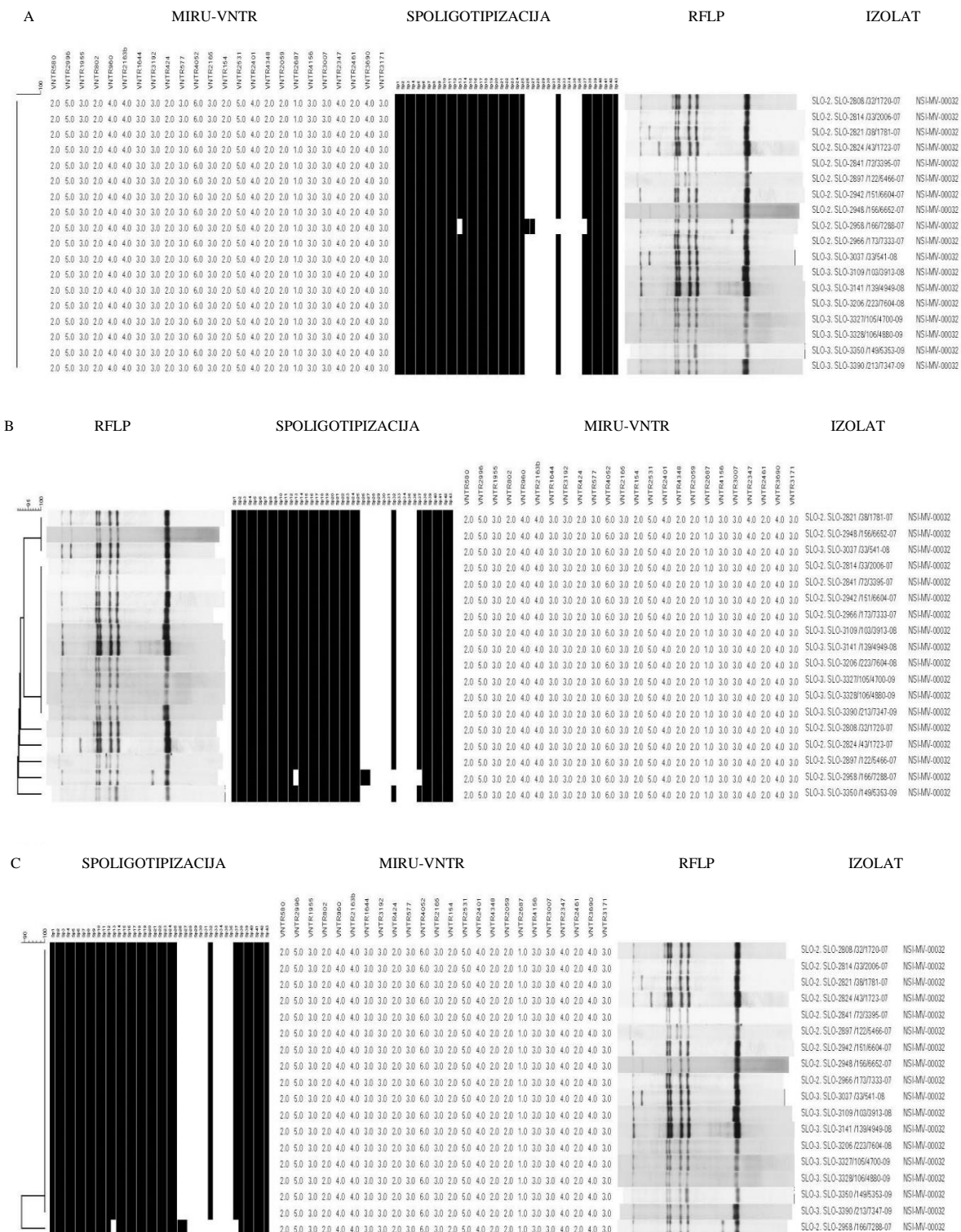
Figure 29: Cluster NSI-MV-00027. Spoligotyping method revealed the same genotypes in comparison to MIRU-VNTR/24. RFLP method has divided strains into four groups. Epidemiologically linked isolates are with all three methods linked in clusters. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

## GENETSKI DRUŽINI NSI-MV-00031 IN NSI-MV-00032

Obe družini sta epidemiološko povezani.

V GD NSI-MV-00031 sta le dva izolata dveh bolnikov (F3194 in F3153) in oba sta povezana z epidemiološkimi podatki saj pripadata prijateljicama. V drugi GD NSI-MV-00032 je 18 izolatov izmed katerih sta dva izolata epidemiološko povezana kot sorodstvena vez (mož in žena, F2814 in F3206). Epidemiološki podatki omenjenima izolatoma dodajo še tretjega, ki je na osnovi metode MIRU-VNTR/24 uvrščen v GD NSI-MV-272 (F3229). Izolat F3229 ima le en lokus razlike z GD NSI-MV-00032 in, ker je epidemiološko povezan, ga lahko uvrstimo v GD NSI-MV-00032. Ostali dve metodi ga uvrstita v enotno genetsko družino k prvima dvema izolatoma. Med omenjenimi tremi izolati smo dokazali sorodstvene vezi. Za preostale izolate nismo našli epidemiološke povezave. Genotipi genetskih družin NSI-MV-00031 in GD NSI-MV-00032 se glede na metodo MIRU-VNTR/24 razlikujejo le v enem lokusu. V kolikor bi našli epidemiološko povezanost med njimi, bi jih lahko uvrstili v enotno genetsko družino. Zaenkrat še nismo našli epidemioloških podatkov, ki bi to potrdili (Slika 30, Slika 31).

## NSI-MV-00032

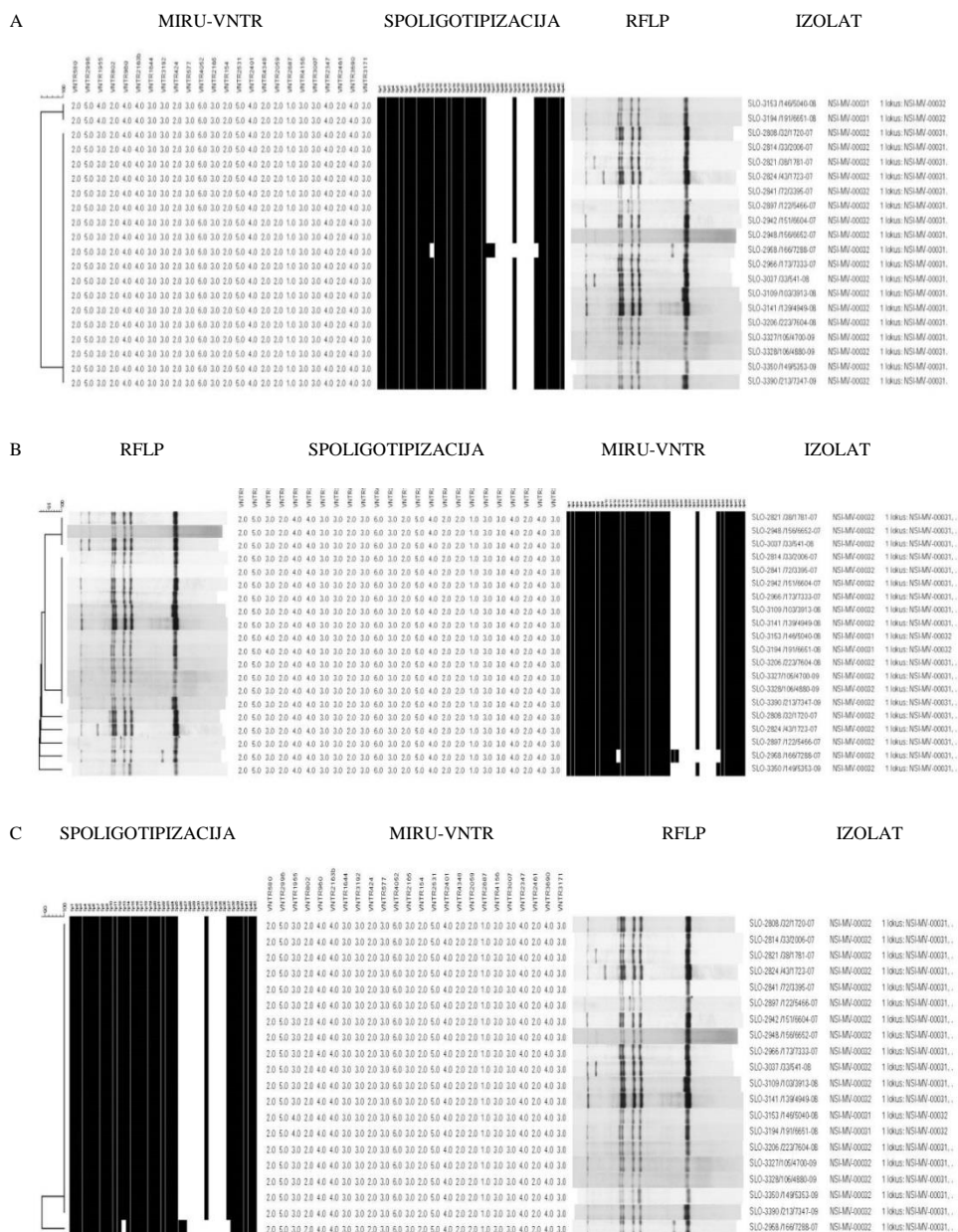


Slika 30: Genetska družina NSI-MV-00032. V GD NSI-MV-00032 je 18 izolatov izmed katerih sta le dva epidemiološko povezana (sorodstvena vez - mož in žena, F2814 in F3206). Epidemiološki podatki omenjenima izolatomata dodajo še tretjega, ki je na osnovi metode MIRU-VNTR/24 uvrščen v GD NSI-MV-

272 (ni prikazano na sliki, F3229). Izolat F3229 ima le en lokus razlike z GD NSI-MV-00032 in ker je epidemiološko povezan ga lahko uvrstimo v GD NSI-MV-00032. Ostali dve metodi ga uvrstita v isto genetsko družino k prvima dvema izolatoma. Med omenjenimi tremi izolati so dokazane sorodstvene vezi. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 30: Cluster NSI-MV-00032. In this cluster there are 17 isolates and only 2 are epidemiologically linked. They are grouped into the same cluster by all three typing methods. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

### ZDRUŽENI NSI-MV-31 in NSI-MV-32



Slika 31: Genetska družina NSI-MV-00031 in NSI-MV-00032. V GD NSI-MV-00031 sta le dva izolata (F3194 in F3153) in oba sta povezana z epidemiološkimi podatki (prijateljici). GD NSI-MV-00032 in epidemiološko povezani izolati so opisani v predhodni sliki. Genotipi genetskih družin NSI-MV-00031 in GD NSI-MV-00032 se glede na metodo MIRU-VNTR/24 razlikujejo le v enem lokusu. V kolikor bi našli epidemiološko povezanost med njimi, bi jih lahko uvrstili v enotno genetsko družino. Zaenkrat še nismo našli epidemioloških podatkov, ki bi to potrdili. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

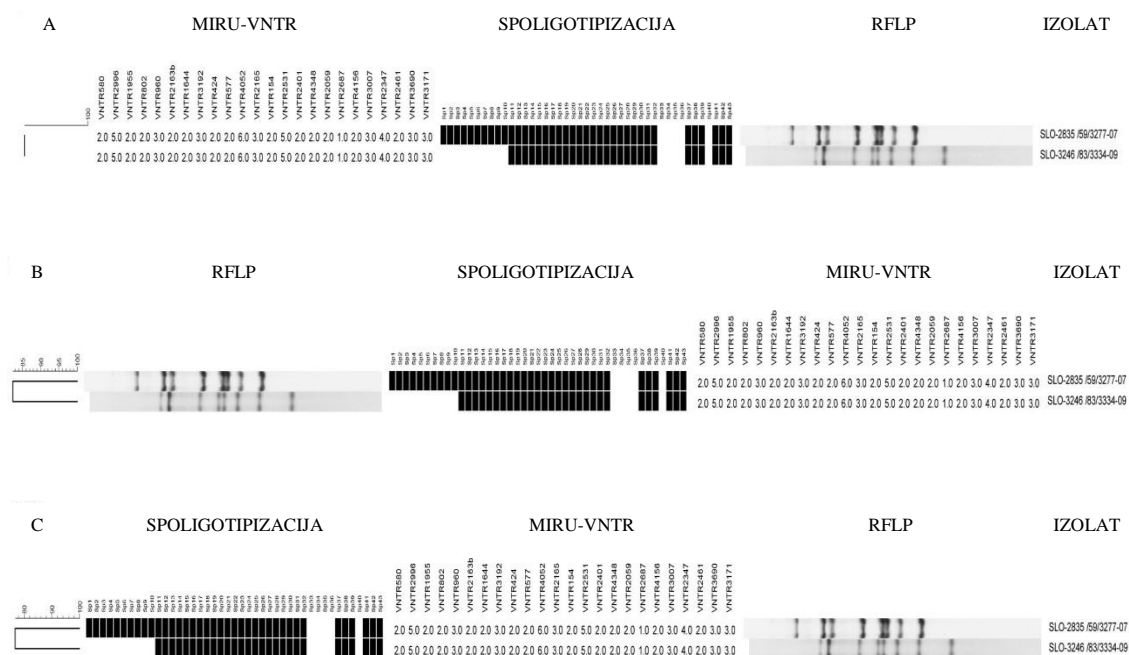
Figure 31: Cluster NSI-MV-00031 and cluster NSI-MV-00032. In cluster NSI-MV-00031 are only two isolates and both are epidemiologically linked (friends). Cluster NSI-MV-00032 is already explained in previous figure. Between cluster NSI-MV-00031 and cluster NSI-MV-00032 is only one locus difference determined by MIRU-VNTR/24 method. If we would be able to find epidemiological link between

mentioned clusters we could define them as one cluster. At the moment we don't have any epidemiological data to confirm our suspicion. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.



## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00239

Genetska družina epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Gre za metodološko ujemanje dveh izolatov v genetski družini (Slika 32).

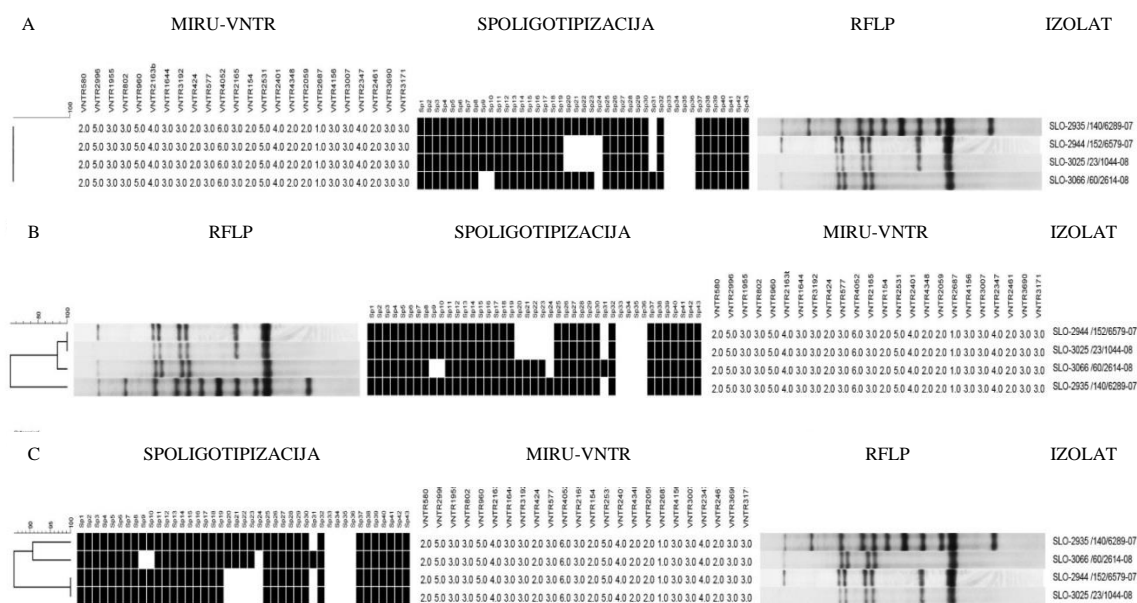


Slika 32: Genetska družina NSI-MV-00239, epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 32: Cluster NSI-MV-00239 is epidemiologically not linked. Spoligotyping together with MIRU-VNTR/24 resolves the same genotyping result as RFLP method. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00029

Genetska družina epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Gre za metodološko ujemanje štirih izolatov v genetski družini (Slika 33).

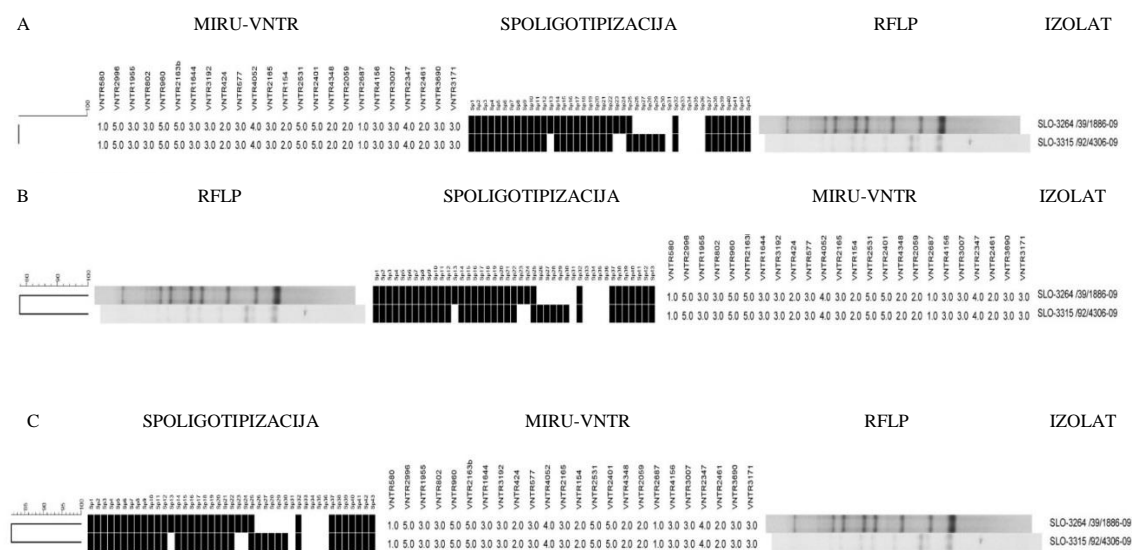


Slika 33: Genetska družina NSI-MV-00029, epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP IS 6110. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 33: Cluster NSI-MV-00029 is epidemiologically not linked. Spoligotyping together with MIRU-VNTR/24 resolves the same genotyping result as RFLP method. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

## GENETSKA DRUŽINA NSI-MV-00309

Genetska družina epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Gre za metodološko ujemanje dveh izolatov v genetski družini (Slika 34).



Slika 34: Genetska družina NSI-MV-00309, epidemiološko ni povezana. Rezultati spoligotipizacije pridruženi rezultatu metode MIRU-VNTR/24 dajo enako moč razlikovanja bacilov tuberkuloze kot metoda RFLP. Analiza narejena na metodi MIRU-VNTR (A), rezultati spoligotipizacije in RFLP le pridruženi, analiza na metodi RFLP (B), rezultati spoligotipizacije in MIRU-VNTR le pridruženi, analiza na metodi spoligotipizacije (C), rezultati MIRU-VNTR in RFLP le pridruženi.

Figure 34: Cluster NSI-MV-00309 is epidemiologically not linked. Spoligotyping together with MIRU-VNTR/24 resolves the same genotyping result as RFLP method. Analysis made on MIRU-VNTR method (A), results of spoligotyping and RFLP only added, analysis made on RFLP method (B), results of spoligotyping and MIRU-VNTR only added and analysis made on spoligotyping method (C), results of MIRU-VNTR and RFLP only added.

## 4.5 NEPOSREDNA GENOTIPIZACIJA IZ KLINIČNIH VZORCEV

### 4.5.1 Prvi vzorci

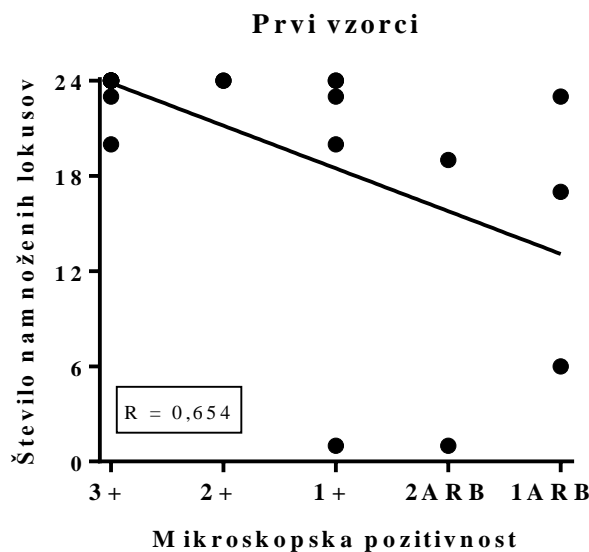
V analizo je bilo vključenih 26 bolnikov s tuberkulozo. Med 26 prvimi vzorci, ki so bili vključeni v prvi del analize, je bilo 13/26 (50 %) mikroskopsko visoko pozitivnih (3+), ostali so imeli nižjo mikroskopsko pozitivnost in sicer je imelo mikroskopsko pozitivnost 2+ 3/26 (11,5 %), 1+ 5/26 (19,2 %), 2ARB 2/26 (7,7 %) in 1ARB 3/26 (11,5 %) (Preglednica 16).

Preglednica 16: Rezultati tipizacije iz kliničnih vzorcev (n=26) z metodo MIRU-VNTR/24 povezanih z mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev.

Table 16: MIRU-VNTR typing results of *M. tuberculosis* from all first samples taken from newly detected patients with tuberculosis ( $n = 26$ ) correlated with smear microscopy result.

	3+	2+	1+	2ARB	1ARB	SKUPAJ
Tipizacija uspešna v prvem poskusu	5	2				7
Tipizacija uspešna v drugem poskusu	6	1	2			9
Tipizacija ni popolnoma uspešna	2		2	2	3	9
Tipizacija neuspešna – ni rezultata			1	0		1
<b>SKUPAJ</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>26</b>

Popolnoma tipiziranih je bila več kot polovica prvih vzorcev 16/26 (61,4 %) in uspešnost tipizacije je bila povezana s stopnjo mikroskopske pozitivnosti. Izmed teh 26 vzorcev jih je imelo 16 najvišjo mikroskopsko pozitivnost (3+ in 2+), 14 (87,5 %) le-teh smo uspeli popolnoma tipizirati (Slika 35).



Slika 35: Statistična analiza primerjave med številom namnoženih lokusov in mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev tipiziranih z metodo MIRU-VNTR/24 (n=26). Linearna povezanost med uspešnostjo tipiziranega števila lokusov in višino mikroskopske pozitivnosti je prikazana s premico in koeficientom R. Pozitivnost mikroskopije je označena po sledečem zaporedju 3+ (> 10 bacilov/vidno polje); 2+ (1–10 bacilov/vidno polje); 1+ (10–99 bacilov/100 vidnih polj); 2AFB (7–9 bacilov / 100 vidnih polj), and 1 AFB (3–6 bacilov/100 vidnih polj).

Figure 35: The number of amplified loci in correlation with smear microscopy. Samples (n=26) were typed with MIRU-VNTR/24 typing method. The calculated curve and coefficient (R) of linear correlation is also indicated first sample set. Smear microscopy grades are coded as follows: 3+ (> 10 bacilli/field); 2+ (1–10 bacilli/field); 1+ (10–99 bacilli / 100 fields); 2AFB (7–9 bacilli / 100 fields), and 1 AFB (3–6 bacilli / 100 fields).

#### 4.5.2 Ostali vzorci

Pri zgoraj omenjenih 26 bolnikih smo poleg prvih 26 vzorcev analizirali še dodatnih 53 vzorcev, ki so bili bolnikom odvzeti kasneje v obdobju zdravljenja (do 83 dne). Vzorci so bili bolnikom praviloma odvzeti vsak teden, do prvega mikroskopsko negativnega vzorca. Pri nekaterih bolnikih tovrsten režim jemanja vzorcev ni bil možen zaradi poslabšanja zdravstvenega stanja. V teh primerih smo vzeli v analizo vzorce, ki smo jih dobili, ko je to dopuščalo zdravstveno stanje bolnika.

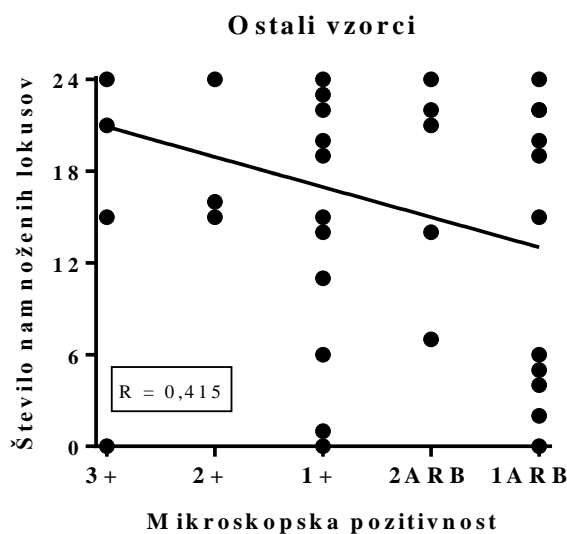
Med 53 vzorci, ki so bili vključeni v drugi del analize je bilo 12/53 (22,6 %) mikroskopsko visoko pozitivnih (3+), ostali so imeli nižjo mikroskopsko pozitivnost in sicer je imelo mikroskopsko pozitivnost 2+ 5/53 (9,4 %), 1+ 19/53 (35,8 %), 2ARB 6/53 (11,3 %) in

1ARB 7/53 (13,2 %). Štirje vzorci so bili mikroskopsko negativni, vendar smo 3 od 4 uspeli delno tipizirati (Preglednica 17).

Preglednica 17: Rezultati tipizacije iz kliničnih vzorcev vzetih med nadaljnim zdravljenjem bolnikov s tuberkulozo (n=53) tipiziranih z metodo MIRU-VNTR/24 v povezavi z njihovo mikroskopsko pozitivnostjo.  
Table 17: MIRU-VNTR typing results of *M. tuberculosis* from follow-up samples taken from newly detected patients with tuberculosis (n = 53) correlated with smear microscopy result.

	3+	2+	1+	2ARB	1ARB	NEG	SKUPAJ
Tipizacija popolnoma uspešna	9	3	6	1	1	0	<b>20</b>
Tipizacija ni popolnoma uspešna	2	2	11	5	6	3	<b>29</b>
Tipizacija neuspešna – ni rezultata	1	0	2	0	0	1	<b>4</b>
<b>SKUPAJ</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>53</b>

Popolnoma tipiziranih je bila manj kot polovica vzorcev 20/53 (37,7 %) in uspešnost tipizacije je bila tudi pri tej skupini vzorcev povezana s stopnjo mikroskopske pozitivnosti. Izmed 53 vzorcev jih je imelo 17 najvišjo mikroskopsko pozitivnost (3+ in 2+), med njimi smo jih 12 (70,6 %) uspeli popolnoma tipizirati (Slika 36).



Slika 36: Statistična analiza primerjave med številom namnoženih lokusov in mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev tipiziranih z metodo MIRU-VNTR/24 (n=53). Linearna povezanost med uspešnostjo tipiziranega števila lokusov in višino mikroskopske pozitivnosti je prikazana s premico in koeficientom R. Pozitivnost mikroskopije je označena po sledečem zaporedju 3+ (> 10 bacilov/vidno polje); 2+ (1–10 bacilov/vidno polje); 1+ (10–99 bacilov/100 vidnih polj); 2AFB (7–9 bacilov / 100 vidnih polj), and 1 AFB (3–6 bacilov/100 vidnih polj).

Figure 36: The number of amplified loci in correlation with smear microscopy. Samples (n=53) were typed with MIRU-VNTR/24 typing method. The calculated curve and coefficient (R) of linear correlation is also indicated first sample set. Smear microscopy grades are coded as follows: 3+ (> 10 bacilli/field); 2+ (1–10 bacilli/field); 1+ (10–99 bacilli / 100 fields); 2AFB (7–9 bacilli / 100 fields), and 1 AFB (3–6 bacilli / 100 fields).

#### 4.5.3 Vsi vzorci

Skupno število kliničnih vzorcev tipiziranih z metodo MIRU-VNTR/24 je bilo 79 (26 prvih vzorcev in 53 dodatnih vzorcev, odvzetih v nadaljnjem obdobju zdravljenja). Odvzeti so bili 26 bolnikom s tuberkulozo.

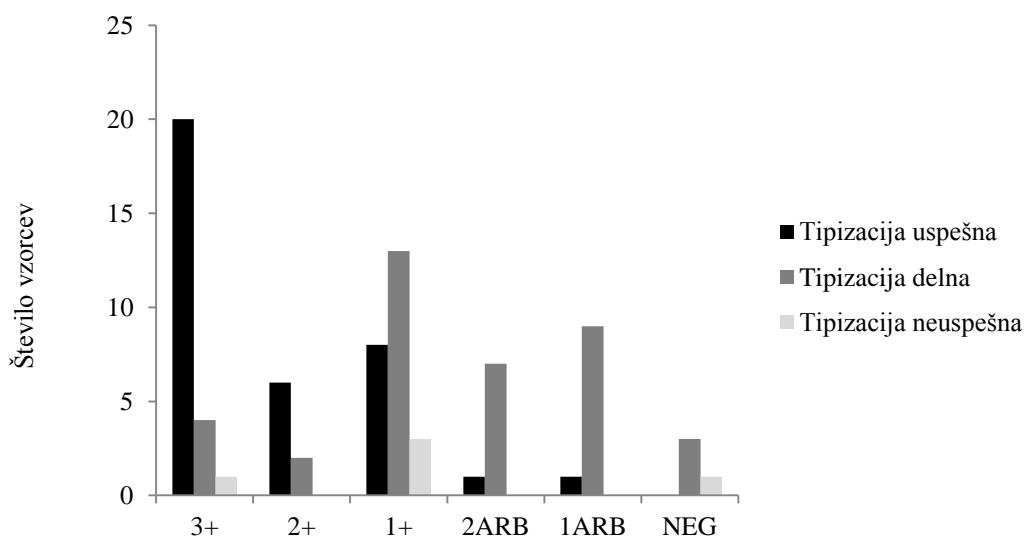
Izmed 79 kliničnih vzorcev smo jih uspeli popolnoma tipizirati 36 (45,6 %), 38 (48,1 %) delno (uspešno tipiziranih 1 do 23 od 24 lokusov) in preostalih 5 (6,3 %), ki jih nismo uspeli tipizirati (niti en lokus uspešno namnožen).

Rezultati tipizacije neposredno iz kužnine so pokazali na nivoju bolnikov s tuberkulozo, da smo uspeli pri 18 (69,2 %) bolnikih z metodo MIRU-VNTR/24 dobiti popoln genotip (24 mestna koda) pri vsaj enem izmed odvzetih vzorcev. Pri ostalih osmih bolnikih (30,8 %) smo dobili delni rezultat tipizacije z minimalno namnoženih vsaj 16 lokusov.

Dokazali smo statistično značilno povezavo med uspešnostjo tipizacije in mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev tako pri prvi skupini ( $p=0,0003$ ), kot tudi pri drugi skupini vzorcev ( $p=0,002$ ). Višja kot je bila mikroskopska pozitivnost, uspešnejša je bila tipizacija (Slika 35, Slika 36).

Enako povezavo med uspešnostjo tipizacije in mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev smo dokazali tudi na nivoju pomnoževanja posameznih lokusov. Dokazali smo, da je lokus 4156 najtežje pomnožiti, saj je bila njegovo pomnoževanje neuspešno v 16 % pri 3+ pozitivnih vzorcih, 25 % pri 2+, 62,5 % pri 1+, 62,5 % pri 2 ARB in kar v 80 % pri 1 ARB mikroskopsko pozitivnih vzorcih. Za ta lokus se je pokazalo, da je bil največkrat neuspešno pomnožen tudi v primerih, ko smo uspeli stipizirati vseh ostalih 23 lokusov. Glede na odstotek neuspešnega pomnoževanja so omenjenemu lokusu po neuspešnosti sledili še lokus 1644, 960 in 3192.

Analiza podatkov je razvidna iz Slike 37 in Preglednice 18.



Slika 37: Rezultat tipizacije MIRU-VNTR/24 79 vzorcev odvzetih 26 bolnikom s tuberkulozo v povezavi z mikroskopsko pozitivnostjo vzorcev. Pozitivnost mikroskopije je označena po sledečem zaporedju 3+ (> 10 bacilov/vidno polje); 2+ (1–10 bacilov/ vidno polje); 1+ (10–99 bacilov/100 vidnih polj); 2AFB (7–9 bacilov / 100 vidnih polj), and 1 AFB (3–6 bacilov/100 vidnih polj).

Figure 37: MIRU-VNTR typing results of all 79 samples taken from 26 patients with tuberculosis in correlation with smear microscopy result. Smear microscopy grades are coded as follows: 3+ (> 10 bacilli/field); 2+ (1–10 bacilli/field); 1+ (10–99 bacilli / 100 fields); 2AFB (7–9 bacilli / 100 fields), and 1 AFB (3–6 bacilli / 100 fields).



Preglednica 18: Tipizacija MIRU-VNTR/24 79 kliničnih vzorcev odvzetih pri 26 bolnikih s tuberkulozo v povezavi s časom zdravljenja bolnikov. Manjkajoči aleli so označeni z *nr* (ni rezultata)  
Table 18: MIRU-VNTR typing results of all 79 samples, taken from 26 patients, depending on initiation of treatment of tuberculosis and result of smear microscopy. Missing alleles are coded as *nr* (i.e., no result).

VZOREC PREJET V LABORATORIJ (D-DAN)	VZOREC PREJET V LABORATORIJ (TEDEN)	OZNAKA BOLNIKA	MIKRO- SKOPLJA	580	2996	802	960	1644	3192	424	577	2165	2401	3690	4156	2163b	1955	4052	154	2531	4348	2059	2687	3007	2347	2461	3171	
0D	I TEDEN	GAL	3+	2	4	2	3	3	3	2	4	3	2	1	2	3	2	5	2	6	2	2	1	3	4	2	3	
0D		OKA	1ARB	3	5	5	3	3	2	3	4	4	2	3	2	nr	1	4	2	5	2	2	1	2	4	2	3	
1D		KSA	3+	2	5	4	2	3	3	2	4	3	2	3	2	3	2	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
1D		HMI	3+	2	5	2	4	3	3	2	3	3	4	4	3	4	3	6	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
1D		OKA	1+	3	5	5	nr	nr	2	3	4	4	2	3	nr	nr	1	nr	2	5	2	2	1	2	4	2	3	
2D		RKA	2ARB	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	1	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
3D		KSA	3+	2	5	4	2	3	3	2	4	3	2	3	2	3	2	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
3D		HHA	2ARB	2	4	4	nr	nr	nr	2	3	3	4	3	nr	nr	6	4	2	5	1	2	1	3	4	2	3	
4D		IAS	3+	2	5	2	4	3	3	2	3	3	4	4	3	4	3	6	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
4D		RFR	3+	2	5	3	3	1	3	2	4	3	2	7	2	3	2	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
4D		BHA	3+	2	5	3	nr	nr	nr	2	3	3	4	3	nr	3	3	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
5D		HDA	3+	2	5	2	4	3	3	2	3	3	4	4	3	4	3	6	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
7D		MRU	1+	3	5	5	3	3	2	3	4	3	2	3	2	4	1	4	2	5	2	2	1	2	4	2	3	
8D		DRUGI TEDEN	KMA	3+	2	5	4	3	1	3	2	4	2	2	5	2	2	2	5	2	5	2	2	1	3	4	3	2
8D	MMI		3+	2	5	1	3	2	3	2	3	3	4	4	3	6	3	7	2	5	1	2	1	3	4	2	3	
8D	LMU		2+	2	5	2	5	3	3	2	3	3	4	3	3	4	3	6	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
8D	HMI		1+	nr	5	nr	nr	nr	nr	nr	3	3	nr	nr	nr	nr	3	nr	nr	nr	nr	2	nr	nr	4	nr	nr	
10D	KSA		3+	2	5	4	2	3	3	2	4	3	2	3	2	3	2	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
10D	HHA		1+	2	4	4	nr	nr	nr	2	3	3	4	3	nr	6	6	4	nr	nr	nr	nr	nr	nr	4	2	3	
11D	IAS		3+	2	5	2	4	3	3	2	3	3	4	4	3	4	3	6	2	5	2	2	1	3	nr	nr	nr	
11D	ČIV		2+	2	5	2	4	3	3	2	3	3	4	4	3	4	3	6	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
11D	RFR		1+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
12D	MRU		2ARB	3	5	5	3	3	2	3	4	3	2	3	2	4	1	4	2	5	2	2	1	2	4	2	3	
12D	BHA		3+	2	5	3	3	3	3	2	3	3	4	3	3	3	3	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
13D	BFI		3+	2	5	3	3	3	3	2	4	2	2	3	2	3	2	3	2	6	2	2	1	3	4	2	3	
13D	LMU		3+	2	5	2	5	3	3	2	3	3	4	3	3	4	3	6	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
13D	HKA		1+	2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
14D	KSA	3+	2	5	4	2	3	3	2	4	3	2	3	2	3	2	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3		
14D	KVI	1+	2	5	3	4	3	2	1	2	2	1	2	nr	1	3	6	1	6	2	2	1	3	4	2	3		
14D	SJE	1+	2	5	2	3	2	3	2	3	3	2	3	2	4	2	4	2	5	2	2	1	3	4	2	3		
14D	MMI	2ARB	2	5	1	nr	nr	nr	2	3	3	nr	nr	nr	nr	3	nr	2	5	2	2	nr	nr	4	2	3		
14D	BHA	3+	2	5	3	3	3	3	2	3	3	4	3	3	3	3	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3		
15D	TRETJI TEDEN	KVI	1+	2	5	3	4	3	2	1	2	2	1	2	2	1	3	6	1	6	2	2	1	3	4	2	3	
15D		TVI	3+	4	5	6	3	1	2	3	4	3	2	3	nr	3	2	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
15D		RFR	1+	2	5	3	3	1	3	2	4	3	2	7	2	3	2	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
15D		BMA	3+	2	5	3	5	3	3	2	3	3	4	3	3	4	3	4	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
16D		JMI	2+	4	5	4	3	3	3	4	3	3	2	3	2	5	1	9	3	5	2	2	1	3	2	2	3	
17D		HHA	NEG	2	4	nr	nr	nr	nr	2	3	3	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
17D		HMI	2+	2	5	2	nr	nr	nr	2	3	nr	4	nr	nr	4	3	nr	2	nr	2	2	1	3	4	2	3	
18D		BFI	2+	2	5	3	3	3	3	2	4	2	2	3	2	3	2	3	2	6	2	2	1	3	4	2	3	
19D		MRA	3+	1s	5	3	5	3	3	2	3	3	4	3	3	2	3	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	
20D		IAS	3+	2	5	2	nr	nr	nr	2	3	nr	4	nr	nr	nr	3	nr	2	nr	2	2	1	3	4	2	3	
20D		LMU	1+	2	nr	2	nr	nr	nr	nr	3	3	nr	3	nr	4	nr	nr	2	5	nr	nr	1	nr	4	2	nr	
20D		KKL	1ARB	2	nr	2	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	3	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	4	2	3
21D		KSA	3+	2	5	4	2	3	3	2	4	3	2	3	2	3	2	5	2	5	1	2	1	3	4	2	3	
21D		BHA	1+	2	5	3	3	nr	3	2	3	3	4	3	nr	3	3	5	2	5	2	2	1	3	4	2	3	

Se nadaljuje



Primerjava rezultatov tipizacije iz kliničnih vzorcev in tipizacije iz njihove pripadajoče bakterijske kulture je pokazala popolnoma identične rezultate. Genotipi vseh 76 vzorcev so se popolnoma ujemali.

V naši raziskavi smo želeli ovrednotiti tudi pomen posameznega lokusa znotraj njihovega skupnega števila ( $n=24$ ). Tovrstno ovrednotenje ima pomen pri analizi posameznega lokusa, ki ga ni možno namnožiti. Pomemben je podatek, kakšna vlogo ima njegov izostanek pri razvrščanju izolata v genetsko družino. Da bi lahko ovrednotili izostanek posameznega lokusa znotraj celotnega genotipa smo retrospektivno analizirali 919 izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* iz naše nacionalne zbirke izolatov. Ugotovili smo največjo raznolikost lokusov 4052 in 2163b. Njuna raznolikost je razpršena na 13 različnih alelov. V kolikor ne bi uspeli pomnožiti enega izmed alelov s tako visoko raznolikostjo, bi težko ustrezno uvrstili izolat v genetsko družino. Nasprotno, pa bi izostanek lokusa z zelo nizko raznolikostjo zelo malo vplival na uvrstitev izolata v genetsko družino.

In prav lokus 4156, ki ga v naši raziskavi največkrat nismo uspeli namnožiti je pokazal zelo nizko raznolikost, saj je bila razporejena v največjem odstotku ( $> 95\%$ ) le na dva različna alela (alel 2 in 3). To nam je lahko v zelo veliko pomoč, ko želimo ugotoviti s kakšno verjetnostjo lahko določen genotip, ki ga nismo uspeli popolnoma tipizirati, uvrstimo v določeno genetsko družino. V odvisnosti od oznake lokusa lahko na osnovi retrospektivne analize predvidimo verjetnost uvrščanja izolatov v genetske družine (Preglednica 19).



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 VREDNOTENJE METOD MOLEKULARNE TIPIZACIJE BAKTERIJ IZ SKLOPA *M. tuberculosis*

Geografska razširjenost tuberkuloze v Sloveniji v letih od 2007 do 2009 nakazuje njeno razpršenost po celotni državi. Po pričakovanjih je njena največja pojavnost v največjih slovenskih krajih (Ljubljana, Maribor, Kranj, Koper...), najmanj pa se v tem obdobju pojavlja na območju Krasa, Kozjaka, Zgornje Dravske doline, na Koroškem in na območju J dela Bele krajine. Slovenija ima veliko prednost pred ostalimi evropskimi državami, saj je po velikosti med manjšimi, zato je nadzor nad tuberkulozo lahko učinkovitejši. Poleg Nacionalnega referenčnega laboratorija za mikobakterije na Golniku, ima le še dva laboratorija v državi, kjer se izvaja izolacija mikobakterij na primarni ravni (mikroskopski pregled klužnin in kultivacija mikobakterij na gojiščih). Mreža nadzora nad tuberkulozo je zaradi naše majhnosti in organiziranosti zelo učinkovita. V Nacionalnem referenčnem laboratoriju za mikobakterije na Golniku se vsi izolati bacilov tuberkuloze v državi identificirajo, prav tako se vsem izolatom novoodkritih bolnikov določi občutljivost za protituberkulozna zdravila. Od leta 1999 načrtno shranjujemo v Slovenski nacionalni zbirki DNK vseh bacilov tuberkuloze pri vseh novoodkritih bolnikih v državi in od leta 1995 tudi DNK vseh večkratnoodpornih izolatov. Tako današnja zbirka obsega preko 4000 DNK izolatov, več kot 4500 izolatov živih bakterijskih kultur bacilov tuberkuloze in še več izolatov netuberkuloznih mikobakterij.

Na Golniku se zdravi približno 70 % vseh bolnikov s tuberkulozo v Sloveniji in tudi zato je učinkovitost nadzora nad tuberkulozo lahko boljša kot v drugih državah. Hkrati se nahaja v Kliniki Golnik tudi Register za tuberkulozo, kjer se zbirajo in analizirajo epidemiološki podatki bolnikov s tuberkulozo. Centraliziranost vseh treh enot (laboratorij, bolniški oddelek, register) omogoča kar največjo učinkovitost nadzora nad tuberkulozo v naši državi.

Začetki učinkovitega nadzora nad tuberkulozo v Sloveniji segajo v leto 1996, ko je bil popolnoma prenovljen Nacionalni program za nadzor nad tuberkulozo imenovan »Program

obvladovanja tuberkuloze«. Takrat so koordinator za tuberkulozo v Sloveniji (Jurij Šorli), vodja bolniškega oddelka (Damjan Eržen) in vodja laboratorija za mikobakterije (Manca Žolnir-Dovč), postavili nove smernice, tako na področju diagnostike, kot tudi zdravljenja in epidemiologije bacilov tuberkuloze. Pravilno načrtana pot je obrodila sadove v prihajajočih letih, saj se je pojavnost tuberkuloze v državi znižala iz 28,27 novoodkritih bolnikov s tuberkulozo / 100.000 prebivalcev v letu 1996 na 6,8 novoodkritih bolnikov s tuberkulozo / 100.000 prebivalcev v letu 2013 (podatki Registra za tuberkulozo Golnik).

Metoda izbora tipizacije bacilov tuberkuloze je bila na začetku RFLP. V letu 1999 jo je v vsakdanje delo uvedla vodja Laboratorija za mikobakterije Manca Žolnir-Dovč. Metoda je bila takrat v svetu že uveljavljena (van Embden in sod., 1993), kasneje so razvili še računalniški program za njeno analizo (GelCompar današnji Bionumerics) in postopno so Nizozemci ustvarili veliko genotipizacijsko banko podatkov (Heersma in sod., 1998). Tako je metoda RFLP postala prva mednarodno standardizirana metoda genotipizacije, ki jo je Slovenija v letu 1999 kot četrta država na svetu izvajala na nacionalnem nivoju in rezultate epidemiološko zanimivih izolatov pošiljala tudi v evropsko bazo tovrstnih podatkov, to je na Nizozemsko. To so bili prvi začetki odkrivanja prenosa bacilov tuberkuloze v Sloveniji in s to metodo je Žolnir in sod. (2001) opisala najpomembnejše dejavnike tveganja za obolenje s tuberkulozo. Dokazali so do tedaj neznane prenose bacilov tuberkuloze (prenos z bronhoskopom, okužbe zdravstvenih delavcev), razjasnjene so bile mnoge mikroepidemije v državi in gostinski lokali so bili prepoznani kot najpomembnejše in najpogostejše mesto, kjer so se prenosi dogajali. Metoda sama se je pokazala za zelo učinkovito in bila v veliko pomoč epidemiološki službi pri nadzoru tuberkuloze. Z razvojem novih genotipizacijskih metod smo tudi na Golniku želeli slediti sodobnim smernicam in v letu 2003 dopolnili bazo RFLP genotipov s spoligotipizacijo. Podatke spoligotipizacije lahko prikažemo na več možnih načinov: slikovno, binarno ali kot oktalni zapis, kar je pripomoglo k lažji mednarodni prepoznavnosti rezultatov te tipizacijske metode (Dale in sod., 2001; Sebban in sod., 2002). Spoligotipizacija je za razliko od metode RFLP pokazala možnost razlikovanja posameznih vrst iz sklopa *M. tuberculosis*. Tako imajo zelo značilen in med seboj različen spoligovzorec izolati *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti* in *M. canetti* (Streicher in sod., 2007; Gori in sod., 2005; van Embden in sod., 2000).

Med slovenskimi izolati smo v triletnem obdobju naše doktorske raziskave prepoznali dva izolata *M. caprae*. Spoligovzorec ga zelo jasno loči od bacilov *M. tuberculosis*, saj ima na mestih S33-S36 prisotne oligonukleotide (pozitivna hibridizacija), ki jih *M. tuberculosis* na tem mestu nikoli nima. Z drugima dvema tipizacijskima metodama to ločevanje ni možno. Velika prednost te metode je tudi v njeni večji moči razlikovanja izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*, ki imajo manjše število kopij zaporedja IS6110 ( $\leq 5$  kopij IS6110) (Goyal in sod., 1997; Sola in sod., 1998). Med slovenskimi izolati je v triletnem obdobju le 8 takšnih, ki imajo 5 ali manj IS6110 kopij in v našem primeru večjega razlikovanja tovrstnih izolatov nismo dokazali. Rezultate spoligotipizacije smo poslali v tujino in slovenske izolate uvrstili v mednarodne genetske linije in s tem pripomogli k večjemu številu izolatov v svetovni banki spoligotipov (SITVIT, Demay in sod., 2012), izolatom pa dodali informacijo o njihovem izvoru in lastnostih. Spoligotipi slovenskih izolatov v letih 2007 do 2009 so pokazali, da je med našimi izolati le eden, ki spada v najbolj znano genetsko linijo Beijing, ki je v svetovnem merilu med najbolj zastopanimi, invazivnost in odpornost njenih izolatov proti protituberkulotikom pa zelo velika (Demay in sod., 2012; Filliol in sod., 2002; Marais in sod., 2006; Kremer in sod., 2004; Zozio in sod., 2005). Spoligovzorec te družine je zelo značilen in lahko prepoznaven saj ima odsotne oligonukleotide S1-S34, pozitivna hibridizacija pa je zaznana na zadnjih 9 nukleotidih (S35-S43). Prisotnost le enega spoligotipa iz družine Beijing nakazuje, da svetovna migracija ljudi in s tem prenos najinvazivnejših bacilov tuberkuloze iz drugih držav, do danes še nista v veliki meri dosegla Slovenije. To potrjuje tudi podatek, da je bilo v Sloveniji od leta 1995 prepoznanih le 22 večkratnoodpornih izolatov *M. tuberculosis* (MDR oz. XDR) (podatki Laboratorija za mikobakterije Golnik).

Ostale svetovne genetske linije so tako kot v svetu, najbolj zastopane tudi pri nas, kar je razvidno iz preglednice SITVIT banke spoligotipov (Brudey in sod., 2006; Demay in sod., 2012) in ostalih analiz spoligovzorcev po svetu (Demay in sod., 2012; Filliol in sod., 2002; Sola in sod., 2001b; Soini in sod., 2000; Sola in sod., 1999; Guernier in sod., 2008; Brudey in sod., 2004; Puustinen in sod., 2003; Sola in sod., 2001a; Filliol in sod., 2003; David in sod., 2007; Bonura in sod., 2014; Cáceres in sod., 2014). Družina T in njena poddružina T1 (SIT 53) ima v omenjeni spoligo banki podatkov največjo frekvenco pojavljanja, med slovenskimi izolati pa je T1, opažena, kot druga največja družina. V tej svetovni

poddružini se nahaja tudi največja slovenska genetska družina (108 izolatov) določena z metodo spoligotipizacije. V Sloveniji je prepoznana kot najbolj zastopana spoligo družina Haarlem, s poddružinama H1 in H3. Tudi podatki svetovnih spoligobaz pokažejo podoben podatek, še posebej to velja za poddružino H3 (Demay in sod., 2012; Filliol in sod., 2002). Svetovni genetski spoligo družini Haarlem in T, ki sta v Sloveniji zastopani v največji meri, združujeta 80 % vseh slovenskih izolatov, analiziranih v letih 2007 do 2009. Ostale genetske družine so razporejene v preostalih 20 % slovenskih izolatov (družina S, LAM, Ural, Tur, T4, EAI, Delhi/Cas, Caprae, Cameroon, SLOV1, Beijing) (Preglednica 9, Slika 22).

Primerjalno gledano se je enaka prisotnost spoligo genetskih linij pokazala tudi pri epidemiološko povezanih genetskih družinah. Med njimi je bilo največ spoligovzorcev iz linije Haarlem (10/23, 43,5 %), ki se v svetovni spoligobazi pojavlja kot največja spoligo družina v vzhodni Evropi in je kot druga največja spoligo družina na celotnem Evropskem kontinentu (24 %) (Demay in sod., 2012). Druga najbolj zastopana linija je bila T (8/23, 34,8 %), ki se v svetovni spoligobazi pojavlja kot največja spoligo družina Evropi in prevladuje v severni, južni in zahodni Evropi (35 %) (Demay in sod., 2012). Preostalih 5 epidemiološko povezanih družin je pripadalo linijam T4-CEU1, TUR, S in LAM.

Spoligotipizacija je s svojo možnostjo prepoznavanja svetovnih genetskih linij postala zelo razširjena metoda po svetu, vendar je njena nizka moč razlikovanja bacilov tuberkuloze preprečila, da bi postala metoda izbora za tipizacijo bacilov tuberkuloze. Postala je dopolnilna metoda ostalim tipizacijskim metodam. Po pričakovanjih so raziskovalci iskali primernejšo metodo tipizacije na osnovi PCR, katere moč razlikovanja bacilov tuberkuloze bi se približala metodi RFLP. Potrebno je bilo najti metodo, ki bi bila enostavnejša, hitrejša, njena moč razlikovanja pa zadovoljiva, torej večja kot jo ima spoligotipizacija. Proti koncu devetdesetih let preteklega stoletja je v ospredje prišla metoda MIRU-VNTR, druga metoda katere osnova je PCR, ki je dosegla široko uporabnost po vsem svetu. V začetku je metoda vključevala le 12 oziroma 15 lokusov, ki naj bi predstavljali osnovni nabor označevalcev. Raziskava enoletnih rezultatov na slovenskih izolatih, je pokazala, da MIRU-VNTR/15 loči slovenske izolate zelo podobno kot MIRU-VNTR/24 (Bidovec-Stojkovic in sod., 2011). Raziskave po svetu, v državah kjer je migracija in priseljevanje



večje in kjer izolati niso tako homogeni so pokazale, da izbor 15 lokusov ne zadosti nivoja metode RFLP. Analizirani so bili različni označevalci (Supply in sod., 1997; Frothingham in Meeker-O'Connell, 1998; Supply in sod., 2000; Mazars in sod., 2001; Roring in sod., 2002; Skuce in sod., 2002) in v letu 2006 je bila metoda MIRU-VNTR/24 mednarodno standardizirana za tipizacijo izolatov *M. tuberculosis* (Supply in sod., 2006). Metodo smo v Sloveniji kot tretjo tipizacijsko metodo uvedli v letu 2009, ko se je na trgu pojavil standardiziran diagnostični komplet (MIRU-VNTR Typing kit, Genoscreen) in hkrati je bila še istega leta s strani Evropskega centra za nadzor bolezni izbrana kot metoda izbora za tipizacijo bacilov tuberkuloze. V ta namen poteka, v državah Evropske unije in tudi izven njenih meja, projekt nadzora nad večkratno odpornimi izolati bacilov tuberkuloze (MDR) (De Beer in sod., 2014b), kot tudi zunanja kontrola izvajanja metode MIRU-VNTR/24 (De Beer in sod., 2012; De Beer in sod., 2014c). V celotno shemo nadzora tuberkuloze v Evropi pod okriljem ECDC je vključena tudi Slovenija (De Beer in sod., 2012; De Beer in sod., 2014a; De Beer in sod., 2014b; ECDC, Mastering the basis 2011).

Vsako metodo vedno odlikujejo njene specifične lastnosti, ki se lahko pokažejo kot različno pomembne v različnih okoljih, to je v različnih epidemioloških razmerah. V ta namen smo ovrednotili metodo MIRU-VNTR/24 na slovenskih izolatih v primerjavi z ostalima dvema molekularnima tipizacijskima metodama, ki smo ju do tedaj uporabljali v namen prepoznavanja prenosa bacilov tuberkuloze (RFLP in spoligotipizacija). Želeli smo ugotoviti, kakšna je njena moč razlikovanja slovenskih izolatov. V literaturi se pogosto navaja in priporoča kot vzporedno delo hkratno uporabo metode MIRU-VNTR/24 in spoligotipizacije (Oeleman in sod., 2007; Allix-Beguec in sod., 2008a; Bidovec-Stojkovic in sod., 2011; Roetzer in sod., 2011, De Beer in sod., 2013, Jonsson in sod., 2014), saj naj bi rezultati obeh metod skupaj, dosegali večjo moč razlikovanja in se približali metodi RFLP, zato smo naredili tudi analizo omenjene primerjave. Njen enostaven rezultat (24 mestna koda) je doprinesel k široki primerljivosti genotipov po vsem svetu in v ta namen so raziskovalci pripravili dve večji banki podatkov MIRU-VNTRPlus (Allix-Beguec in sod., 2008b; Weniger in sod., 2010) in SITVIT (Demay in sod., 2012). To sta spletni aplikaciji, ki omogočata uporabniku analizo in standardizirano poimenovanje MIRU-VNTR in spoligo rezultatov. Tudi naše izolate smo analizirali z omenjenima spletnima programoma in tako pridobili informacijo o spoligo vzorcih v Sloveniji (Preglednica 9, Slika 17-20).

Analiza genetskih družin dobljenih z metodo MIRU-VNTR/24 v posameznih primerih združenih z rezultati spoligotipizacije je pokazala zelo podobno moč razlikovanja slovenskih izolatov v primerjavi z RFLP, kar se ujema s številnimi raziskavami v Zahodno evropskih državah (Oeleman in sod., 2007; Allix-Beguec in sod., 2008a, Bidovec-Stojkovic in sod., 2011; Roetzer in sod., 2011; De Beer in sod., 2013). Edina izjema so Beijing izolati, ki se širijo zelo hitro, zato so si njihovi kloni med seboj zelo sorodni in med seboj podobni, torej potrebujejo štiri dodatne označevalce s katerimi jih lahko zadovoljivo ločimo (Allix-Beguec in sod., 2014). Ker med slovenskimi izolati Beijing izolati niso pogosti, dodatnih označevalcev nismo testirali.

V našo molekularno epidemiološko raziskavo je bilo zajetih 569 bolnikov, ki so oboleli za tuberkulozo med leti 2007 in 2009 (Register za tuberkulozo Golnik). Vse je epidemiološko ovrednotila epidemiološka služba Klinike Golnik. Pri 148 (26,0 %) bolnikih se je pokazala potencialna možnost za medsebojno epidemiološko povezanost in pri 79 (13,9 %) bolnikih je bila epidemiološka povezanost (prenos bacilov tuberkuloze) tudi dokazana. Kot je že v raziskavi pred leti pokazala metoda RFLP (Žolnir-Dovč in sod., 2003) so bili tudi tokrat najpogostejše mesto, kjer so se prenosili zgodili, gostinski lokali. Velik delež prenosov je bil dokazan tudi med gradbenimi delavci (sodelavci) in sorodniki oz. prijatelji (Preglednica 14).

Številni raziskovalci po svetu so analizirali tri najbolj uporabljene metode tipizacije (RFLP, spoligotipizacija, MIRU-VNTR/24), da bi lahko z vidika metodologije podali rezultate analiz, katera izmed metod najbolje loči bacile tuberkuloze. Cowan in sod. (2002) so analizirali 180 ameriških izolatov *M. tuberculosis*, Kwara in sod. (2003) 64 ameriških izolatov, Van Deutekom in sod. (2005) 125 nizozemskih izolatov, Oeleman in sod. (2007) 154 nemških izolatov, Alix-Beguec in sod. (2008a) 258 belgijskih izolatov, Valcheva in sod. (2008) 133 bolgarskih izolatov, Jiao in sod. (2008) 72 kitajskih izolatov, Glebremichael in sod. (2010) 536 švedskih MDR izolatov, Shamputa in sod. (2010) 208 J korejskih izolatov, Christianson in sod. (2010) 650 kanadskih izolatov, Bidovec-Stojkovic in sod. (2011) 196 slovenskih izolatov, Roetzer in sod. (2011) 277 nemških izolatov, Varma-Basil in sod. (2011) 101 indijski izolat, Vadwai in sod. (2012) 69 indijskih izolatov, Aleksić in sod. (2013) 163 kiribatskih izolatov, Roetzer in sod. (2013) 2301 nemški izolat,

De Beer in sod. (2013) 3975 nizozemskih izolatov in Jonsson in sod. (2014) 406 švedskih izolatov. Z izjemo raziskave Bidovec-Stojkovic in sod. (2011) in De Beer in sod. (2013) so bile primerjave tipizacijskih metod in analize narejene na majhnem deležu vzorcev (2-50 %) pozitivnih izolatov bolnikov v posamezni državi, pri katerih je bila diagnoza tuberkuloze potrjena z osamitvijo bacilov tuberkuloze. Le zgoraj omenjeni raziskavi sta potekali na vseh izolatih, novo odkritih bolnikov s tuberkulozo, osamljenih v določenem obdobju, v določeni državi (Bidovec-Stojkovic - enoletno obdobje, De Beer - 5 letno obdobje). Mi v predhodni enoletni raziskavi (Bidovec-Stojkovic in sod., 2011) nismo vključili epidemioloških podatkov, le metodološke rezultate, ki se v večini ujemajo s pričakovanimi, metoda MIRU-VNTR/24 v povezavi z metodo spoligotipizacije dosega metodološko enak nivo razlikovanja bacilov tuberkuloze v primerjavi z metodo RFLP. De Beer in sod. (2013) pa je v svoji 5-letni analizi metodološkim rezultatom pridružila tudi epidemiološka dognanja. Od 3975 izolatov *M. tuberculosis* jih je bilo 1462 (87 %) epidemiološko raziskanih, v naši 3-letni analizi za doktorsko raziskavo 569 (100 %). Nizozemci so uspeli v 35 % najti epidemiološko povezavo, v naši raziskavi so jo epidemiologi našli v 13,9 % (79/569). Vse raziskave analiz tipizacijskih metod do sedaj, tako regionalne (Roetzer in sod., 2011), populacijske (Alix-Beguec in sod., 2008a) kot tiste na nacionalni ravni (Bidovec-Stojkovic in sod., 2011, De Beer in sod., 2013) so pokazale rahlo višjo diskriminatorno moč metode RFLP v primerjavi z MIRU-VNTR/24, vendar se je tako na Nizozemskem kot tudi v naši raziskavi pokazalo, da so epidemiološko povezane genetske družine, enako dobro opredeljene z obema metodama. Metoda spoligotipizacije občasno, pri nekaterih primerih celo poveča diskriminatorno moč metode MIRU-VNTR/24, kar prav tako sovпада z rezultati primerjalnih analiz iz drugih držav: Nizozemske, Nemčije, Belgije, Bolgarije, Kitajske, Švedske, Kanade in ZDA (Cowan in sod., 2002; Kwara in sod., 2003; Van Deutekom in sod., 2005; Oeleman in sod., 2007; Alix-Beguec in sod., 2008a; Valcheva in sod., 2008; Jiao in sod., 2008; Glebremichael in sod., 2010; Christianson in sod., 2010; Roetzer in sod., 2011; Roetzer in sod., 2013; De Beer in sod., 2013; Jonsson in sod., 2014). Dokazali smo, da metoda MIRU-VNTR/24 spremeni in na novo določi genetske družine opredeljene z metodo RFLP in, da nove genetske družine še vedno ustrezajo epidemiološkim okoliščinam (Preglednica 14, Slike 24-34) in s tem potrdili tudi našo drugo zastavljeno hipotezo.

Metoda MIRU-VNTR/24 se je v analizah, v številnih državah po svetu, kot tudi pri nas, pokazala, kot učinkovita metoda za razlikovanje izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*, kot tudi za razreševanje epidemioloških vprašanj. Rezultati naše raziskave so pokazali, da ima metoda MIRU-VNTR dovolj visoko tipizacijsko moč, da postane tudi pri nas metoda izbora genotipizacije izolatov iz sklopa *M. tuberculosis*. S tem smo potrdili našo prvo zastavljeno hipotezo. Ker je metoda enostavna, hitra in mednarodno standardizirana, bo nedvomno v prihajajočih letih, metoda izbora tipizacije bacilov tuberkuloze v Sloveniji. Njena velika prednost je, da omogoča tipizacijo bacilov tuberkuloze iz prvih bakterijskih kultur in s tem zelo pomembno skrajša čas od odkritja novega bolnika s tuberkulozo do končnega rezultata genotipizacije. Čas je krajši za vsaj tri tedne in rezultat genotipizacije je dostopen že v času, ko je bolnik še v bolnišnici. Genotip je sporočen epidemiološki službi hkrati z rezultatom testa občutljivosti. Njena sposobnost tipizacije neposredno iz kliničnih vzorcev njeno uporabnost in pomen še poveča in najverjetneje bo zaradi svojih lastnosti še nekaj let ostala metoda izbora tipizacije tudi v svetovnem prostoru.

Kljub temu v nacionalnem laboratoriju za tuberkulozo želimo slediti razvoju na tem področju in se zavedamo, da bo v prihodnosti najverjetneje tako pri tipizaciji bacilov tuberkuloze, kot tudi na drugih področjih prevzela vodilno vlogo metoda določanja celotnega genoma bakterij. Zagotovo je to metoda, ki omogoča največje razločevanje organizmov na nivoju DNK (Schürch in van Soolingen, 2012). Metoda želi pojasniti zapletene načine prenosa bacilov tuberkuloze, natančneje raziskati razvojne procese mikobakterij znotraj posameznega bolnika, omogočiti natančnejše prepoznavanje mikobakterij in njihovo odpornost na proti tuberkulozna zdravila (Merker in sod., 2013; Kohl in sod., 2014; Walker in sod., 2013a; Van Soolingen, 2014; Menzies, 2013; Niemann in Supply, 2014; Boritsch in sod., 2014; Stucki in sod., 2014; Roetzer in sod., 2013; Schürch in sod., 2010; Köser in sod., 2012). Zaenkrat je metoda še v razvoju in z njo strokovnjaki poskušajo najti načine, kako povezati podrobne informacije o bakterijskem dednem zapisu in njihovem fenotipskem izražanjem (Sun in sod., 2012; Merker in sod., 2013). WGS je metoda, ki trenutno še ni mednarodno standardizirana za področje tipizacije mikobakterij (Blouin in sod., 2012; Niemann in Supply, 2014), zato je težko primerljiva zunaj okvirov posameznega laboratorija. Svetovne banke podatkov dobljenih s to metodo za sedaj še niso na voljo, z izjemo prve banke podatkov za dokazovanje odpornosti

izolatov *M. tuberculosis* (TBDReaMDB, Sandgren in sod., 2009). Za optimalno napoved odpornosti izolatov bodo potrebne natančnejše in skrbno pripravljene banke podatkov, ki bodo zadovoljivo povezale genetske podatke s fenotipsko obliko odpornosti izolatov na zdravila. S tovrstnimi izzivi se trenutno ukvarja mednarodni konzorcij (<http://patho-ngen-trace.eu/>), ki želi pospešiti izvajanje diagnostike in epidemiologije na osnovi tehnologije NGS (angl., Next Generation Sequencing). Tuberkuloza kot nalezljiva bolezen, ki ne pozna meja, pa za svoj učinkovit nadzor ta trenutek potrebuje metodo, ki bo enostavna, uporabna in dostopna čim širši množici, kot tudi standardizirana, torej mednarodno primerljiva. Zato bomo do nadaljnjega za genotipizacijo bacilov tuberkuloze v praksi še vedno uporabljali metode RFLP, MIRU-VNTR/24 in spoligotipizacijo.

## 5.2 MOLEKULARNA TIPIZACIJA BAKTERIJ IZ SKLOPA *M. tuberculosis* IZ KLINIČNIH VZORCEV

Čas od odvzema vzorca do rezultata genotipizacije bacilov tuberkuloze je velikega pomena za kakovosten epidemiološki nadzor in analizo podatkov o prenosu bacilov tuberkuloze. To je še posebno pomembno v državah, ki bolnike v začetnem obdobju zdravljenja, ko so najbolj kužni za okolico, zdravijo v bolnišnicah. Mednje spada tudi Slovenija. Takrat je pomembno, da imamo rezultat genotipizacije na voljo že v času, ko je bolnik še na zdravljenju v bolnišnici. V svetovnem merilu je naša raziskava prva prospektivna raziskava, ki je skušala dokazati možnost tipizacije bacilov tuberkuloze iz svežih kliničnih vzorcev s standardizirano metodo MIRU-VNTR/24, po protokolu za tipizacijo bacilov tuberkuloze iz bakterijske kulture. Tri predhodne raziskave so vsaka na svoj način želele dokazati možnost tipizacije neposredno iz vzorcev, vendar nobena od njih ni bila prospektivna na neselekcioniranih rutinskih vzorcih. Za razliko od naše raziskave je raziskava Mokrousova s sodelavci (Mokrousov in sod., 2009) za tipizacijo bacilov tuberkuloze iz izmečkov bolnikov s tuberkulozo, okuženih z virusom HIV iz Kirgizistana, uporabila metodo MIRU-VNTR/12. Tipizacijo so dopolnili z dodatnimi testiranjmi treh visoko variabilnih lokusov. V njihovi raziskavi ni podatka o mikroskopski pozitivnosti vzorcev, vendar lahko predvidevamo, da gre za visoko pozitivne vzorce, saj je bila v raziskavo vključena populacija v zaporih, kjer je pogosto bolnik zelo pozno odkrit in neustrezno zdravljen. Zelo dober potencial za neposredno tipizacijo izolatov iz sklopa *M.*

*tuberculosis*, iz zgodnjih kliničnih vzorcev, je pokazala študija iz leta 2012 (Alonso in sod., 2012). Raziskovalci so uspeli dobiti popoln genotip (24 mestna koda) za vse bolnike razen enega. Študija je bila izvedena retrospektivno na izbranih vzorcih, ki so bili visoko mikroskopsko pozitivni, zato tovrstni vzorci ne predstavljajo vsakdanjega nabora kliničnih vzorcev, pri katerih je lahko zelo spremenljiva mikroskopska pozitivnost, kakovost in količina. Raziskava, ki jo opisuje Alonso in sod. (2012) je vsebovala tudi čiščenje PCR produktov, kar je še dodatno pripomoglo k izboljšanju rezultata tipizacije, ne sovпада pa z dnevnim rutinskim delom v laboratoriju, kot je to prikazano v naši raziskavi.

Raziskava na Nizozemskem (De Beer in sod., 2014c) opisuje tipizacijo bacilov tuberkuloze na vzorcih bronhoalveolarne lavaže (BAL), v katere so dodali natančno določeno količino DNK (različne redčitve), nekaj izbranih izolatov *M. tuberculosis*. Tudi rezultati te raziskave ne odražajo realnega stanja tipizacije bacilov tuberkuloze v rutinskem laboratoriju za tuberkulozo. V svoji raziskavi so uporabili optimizirano različico metode MIRU-VNTR/24 in ne standardizirane oblike, kot smo to naredili v naši raziskavi. Kljub temu so bili njihovi odstotki popolnoma genotipiziranih izolatov nižji kot v naši raziskavi. Hkrati je bila naša raziskava v svetovnem merilu tudi prva v katero smo vključili ne samo prve bolnikove vzorce, odvzete ob postavitvi diagnoze tuberkuloze, ampak pri vsakem od 26 bolnikov tudi do 10 dodatnih vzorcev, odvzetih po uvedbi zdravljenja do mikroskopske negativizacije bolnika. Tako smo dokazali uspešnost tipizacije tudi še več tednov po začetku zdravljenja.

Rezultati naše raziskave kažejo, da je uspešna tipizacija z metodo MIRU-VNTR/24 neposredno iz kliničnih vzorcev močno povezana s stopnjo mikroskopske pozitivnosti vzorcev. Kot je bilo pričakovati, je bila opažena višja korelacija ( $R = 0,654$ ) med mikroskopsko pozitivnostjo in številom uspešno določenih lokusov v prvi skupini vzorcev, odvzetih ob postavitvi diagnoze, pred uvedbo zdravljenja (prvi vzorci,  $n = 26$ ) ( $p = 0,0003$ ), v primerjavi z drugo skupino vzorcev, odvzetih v približno tedenskih intervalih po uvedbi zdravljenja do mikroskopske negativizacije (nadaljnji vzorci,  $n = 53$ ) ( $R = 0,415$ ,  $p = 0,002$ ). Mnogi od vzorcev iz druge skupine so bili analizirani več tednov po začetku zdravljenja, ko je mikobakterijska DNK lahko že poškodovana. Kljub temu, smo v naši raziskavi tipizirali bacile tuberkuloze neposredno iz kliničnih vzorcev, tudi še več tednov

po začetku zdravljenja, vendar le v primeru, ko je bila mikroskopska pozitivnost vzorcev še vedno dovolj visoka.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je stopnja uspešnosti tipizacije odvisna tudi od nekaterih značilnosti posameznega kliničnega vzorca. Visoka količina sluzi, sline ali nekaterih zaviralcev v vzorcu (hrana, zdravila...) lahko zniža učinkovitost tipizacije zaradi poškodovane DNK, oziroma zmanjšane količine izločene (ekstrakcija) DNK iz vzorca. Vsaj dva bolnika s svojimi vzorci nakazujeta na potrditev te domneve. Pri prvem bolniku smo zbrali 11 kliničnih vzorcev (od prvega dne, ko je bil bolnik odkrit kot nov primer tuberkuloze do 83 dne), ki so bili različno mikroskopsko pozitivni (3+, 1+, 2ARB, 1ARB). Samo enega vzorca, odvzetega 28 dan po postavitvi diagnoze, mikroskopsko pozitivnega 1+, ni bilo mogoče popolnoma tipizirati, pri vseh ostalih vzorcih smo dobili popoln genotip (Preglednica 18, bolnik KSA). V popolnem nasprotju pa so bili rezultati tipizacije drugega bolnika, pri katerem smo zbrali 7 kliničnih vzorcev, v časovnem obdobju od tretjega dne po določitvi, da gre za novoodkrita bolnika s tuberkulozo, pa do 43 dne. Mikroskopska pozitivnost vzorcev je bila prav tako, kot pri prvem bolniku zelo različna (1+, 2ARB, 1ARB in NEG). V tem primeru, niti en vzorec ni bil tipiziran uspešno, kar pomeni, da niti pri enem vzorcu nismo uspeli pridobiti popoln 24-mestni genotip (Preglednica 18, bolnik HHA). Ti rezultati kažejo, da raziskave, v katerih niso vključeni vsakdanji klinični vzorci, ne kažejo pravega stanja možnosti tipizacije bacilov tuberkuloze iz kliničnih vzorcev, v katerih se nahajajo številne snovi, ki lahko zavirajo uspešnost tipizacije.

Naši rezultati so na nivoju bolnika pokazali uspešnost tipizacije v 69,2 %. Pri 18 bolnikih, od skupno 26, smo uspeli pridobiti popoln genotip pri enem izmed vzorcev. Pri ostalih osmih bolnikih smo uspeli tipizirati najmanj 16 lokusov od skupno 24.

V primerih, ko je genotip nepopoln je pomembno vedeti kakšno vlogo ima posamezen lokus pri uvrščanju genotipa v genetsko družino. V ta namen smo analizirali 919 slovenskih izolatov in ovrednotili pomen posameznega lokusa (pogostost alela na lokusu). Primerjalna analiza je pokazala različno stopnjo pomembnosti, glede na lokus. Lokus 4156, ki je bil pri naših vzorcih najbolj pogosto manjkajoč lokus, je pokazal zelo nizko raznolikost svojih alelov, kar pomeni, da bi lahko tudi brez podatka o tem lokusu z veliko

verjetnostjo genotip uvrstili v določeno genetsko družino. V nasprotju z njim pa je lokus 2163b pokazal eno najvišjih stopenj alelnih raznolikosti med slovenskimi izolati. V primeru, da je manjkajoči lokus 2163b, je zelo težko zanesljivo razvrstiti nek genotip v genetsko družino.

Seveda se moč razvrščanja v genetske družine zmanjšuje z naraščanjem števila manjkajočih lokusov. Pomembno je, da lahko celo nepopolne rezultate genotipizacije, s precejšnjim številom manjkajočih lokusov, izkoriščamo za hitro izključitev suma navzkrižne kontaminacije ali prenosa tuberkuloze.

Da bi uvedli tovrstno tipizacijo bacilov tuberkuloze iz kliničnih vzorcev v dnevno prakso, smo ovrednotili tipizacijo tudi iz stroškovnega vidika. Upoštevajoč le ceno reagentov se je cena tipizacije enega izolata gibala okoli 60€, v kolikor tipizacije ni bilo potrebno ponoviti. Ob nezmožnosti tipiziranja vseh lokusov v prvem poskusu se je cena tipizacije enega izolata podvojila. Analiza je pokazala, da je tipizacija direktno iz kliničnih vzorcev upravičena le v primeru, ko je vzorec dovolj visoko mikroskopsko pozitiven (3+, 2+) in je uspešnost tipizacije zadovoljivo visoka. Takšen način tipizacije, nam lahko omogoča, hitro izključitev suma navzkrižne kontaminacije ali odkritje nedavnega prenosa tuberkuloze med bolniki.

Naša prospektivna raziskava na kliničnih vzorcih je pokazala, da je tipizacija bacilov tuberkuloze s standardizirano metodo MIRU-VNTR/24, prvotno opisano za bakterijsko kulturo, lahko zelo uspešna v primeru, ko je vzorec mikroskopsko dovolj pozitiven. Čeprav bi bilo možno še uspešneje tipizirati bacile tuberkuloze v primeru, da bi standardizirano metodo optimizirali (očiščevanje PCR produktov), smo z našo raziskavo želeli dokazati, da je lahko tipizacija uspešna tudi ob uporabi vsakdanjih protokolov, brez optimizacije, in da lahko z omenjeno metodo, hitro razrešimo nekatera epidemiološka vprašanja, ki potrebujejo nujno obravnavo (Bidovec-Stojkovič in sod., 2014). S tem smo tudi potrdili našo tretjo zastavljeno hipotezo.



### 5.3 SKLEPI

- Triletna primerjalna analiza rezultatov metod RFLP, MIRU-VNTR/24 in spoligotipizacije je pokazala, da lahko metoda MIRU-VNTR/24 ustrezno nadomesti metodo RFLP (v odsotnosti metode spoligotipizacije) in postane metoda izbora tipizacije slovenskih izolatov bacilov tuberkuloze. Epidemiološko povezani bolniki s tuberkulozo so bili ustrezno povezani z obema tipizacijskima metodama.
- Metoda MIRU-VNTR/24 omogoča tipizacijo bacilov tuberkuloze iz prvih bakterijskih kultur in s tem zelo pomembno skrajša čas od odkritja novega bolnika s tuberkulozo do končnega rezultata genotipizacije. Čas tipizacije v primerjavi z metodo RFLP in spoligotipizacije je krajši za vsaj tri tedne in rezultat genotipizacije je dostopen že v času, ko je bolnik še v bolnišnici. Genotip sedaj sporočamo epidemiološki službi hkrati z rezultatom testa občutljivosti.
- Metoda spoligotipizacije služi kot dopolnilna metoda v primeru nejasnosti tipizacijskih rezultatov metode MIRU-VNTR oziroma, ko je potrebno določiti kateri svetovni genetski liniji pripada genotip in bi bila genetska linija pomembna z vidika invazivnosti in odpornosti na zdravila.
- V svetovnem merilu smo prvi dokazali, da je z metodo MIRU-VNTR/24 mogoče tipizirati izolate iz sklopa *M. tuberculosis* neposredno iz kliničnih vzorcev.
- Uspešnost tipizacije z metodo MIRU-VNTR/24 neposredno iz kliničnih vzorcev korelira s stopnjo mikroskopske pozitivnosti vzorca.
- Tipizacija z metodo MIRU-VNTR/24 neposredno iz kliničnih vzorcev je smiselna le v primeru, ko želimo hitro razrešiti nekatera epidemiološka vprašanja, ki potrebujejo nujno obravnavo oziroma želimo izključiti laboratorijsko kontaminacijo.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

Učinkovit nadzor nad širjenjem nalezljive bolezni, kot je tuberkuloza, zagotavljajo le ustrezne metode molekularne genotipizacije, ki odkrivajo prenos okužbe z bacili tuberkuloze med bolniki. Omogočajo nam tudi sledenje uspešnosti zdravljenja tuberkuloze, reaktivacijo tuberkuloze, morebitne okužbe z novim izolatom bacilov tuberkuloze ali celo potrjevanje laboratorijskih kontaminacij.

Metoda molekularne genotipizacije, ki je od leta 1993 v svetu predstavljala zlati standard je metoda polimorfizma dolžine restrikcijskih fragmentov (IS6110 RFLP). Metoda temelji na razlikovanju števila insercijskih sekvenc IS6110 in njihove variabilne lege na kromosomu. Za svojo izvedbo potrebuje veliko količino genomske DNK in je tehnično zelo zahtevna in dolgotrajna. Izven laboratorija so rezultati težko primerljivi. Metoda ima slabo ločljivost za izolate z manj kot pet kopijami omenjene sekvence, zato so v takih primerih za učinkovito tipizacijo potrebne dodatne metode molekularne genotipizacije. Spoligotipizacija je metoda, ki je po svoji naravi zelo enostavna, hitra in ponovljiva. Je metoda, ki se uporablja za tipizacijo izolatov *M. tuberculosis* z manj kot petimi kopijami insercijskih sekvenc IS6110. Ugotavlja polimorfizem na specifičnem delu kromosomalnega lokusa imenovanega »mesto DR« (Direct Repeat region). Rezultat metode je prisotnost oziroma odsotnost 43 specifičnih zaporedij DNK v obliki zaporedja pik (pozitivna hibridizacija) in praznih prostorov (negativna hibridizacija). Nadomestna oblika zapisa rezultata je oktalna koda oziroma mednarodno ime / številka določena z mednarodno bazo spoligovzorcev. Omogoča razlikovanje najpomembnejših vrst bacilov znotraj sklopa *M. tuberculosis* in prepozna najpomembnejše družine.

V letu 2006 je bila standardizirana metoda molekularne genotipizacije z imenom MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Numbers of Tandem Repeats). Metoda je tehnično enostavna in fleksibilna, saj jo lahko izvedemo s pomočjo gelske ali kapilarne elektroforeze. Rezultat metode je 24 mestna koda in omogoča enostavno primerljivost rezultatov znotraj laboratorija in med različnimi laboratoriji. Ima zelo visoko moč razlikovanja izolatov *M. tuberculosis*, primerljivo z metodo RFLP. Zaradi svoje enostavnosti, hitrosti, ponovljivosti in primerljivosti je v letu 2009 s strani ECDC

postala metoda izbora na področju molekularne genotipizacije izolatov *M. tuberculosis*. Slovenija je ena redkih držav na svetu, kjer se je metoda RFLP od leta 2000 uporabljala za genotipizacijo izolatov *M. tuberculosis* na nacionalni ravni. S to metodo je Žolnir s sodelavci opisala najpomembnejše dejavnike tveganja za obolevanje s tuberkulozo. Pojasnjeni so bili mnogi prenos bacilov tuberkuloze, ki so bili do tedaj neznani (prenos z bronhoskopom, okužbe zdravstvenih delavcev), razjasnjene so bile mnoge mikroepidemije v državi in gostinski lokali so bili prepoznani kot najpomembnejše in najpogostejše mesto, kjer so se prenos dogajali. Metoda sama se je pokazala za zelo učinkovito in je bila v veliko pomoč epidemiološki službi pri nadzoru tuberkuloze, kar dokazujejo podatki o znižanju obolevnosti za tuberkulozo iz 19,1 v letu 2000 na 6,7 na 100.000 prebivalcev v letu 2012.

Da bi v Sloveniji lahko sedanjo metodo izbora tipizacije RFLP zamenjala sodobnejša metoda MIRU-VNTR/24, smo naredili obširno retrospektivno analizo rezultatov obeh tipizacijskih metod, na vseh izolatih, v obdobju treh let (2007-2009). Opredelili smo, tako metodološko ujemanje med rezultati obeh metod, kot tudi ujemanje metod s podatki epidemiološke službe (Register za tuberkulozo Golnik). Njuna moč razlikovanja izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* je bila zelo podobna, saj je metoda RFLP določila 385, metoda MIRU-VNTR/24 pa 379 različnih genotipov. Vsi pacienti so bili epidemiološko pregledani in 272 izolatov (47,2 %) uvrščenih v genetske družine z metodo MIRU-VNTR/24 je bilo natančneje analiziranih. Ugotovljenih je bilo 23 genetskih družin z epidemiološko povezanostjo. Izmed 131 izolatov v genetsko povezanih družinah, smo s pomočjo epidemioloških podatkov, 79 bolnikom s tuberkulozo uspeli potrditi prenos. Metoda MIRU-VNTR/24 se v 97,5 % ujema z rezultati metode RFLP. Le v dveh primerih se genotip metode MIRU-VNTR/24 za en lokus razlikuje od primarne genetske družine. Upoštevajoč definicijo uvrščanja genotipov v genetske družine, kjer velja, da v primeru razlike le v enem lokusu ob sočasni epidemiološki potrditvi, lahko tak genotip uvrstimo v prvotno genetsko družino. Torej je ujemanje epidemioloških podatkov z rezultati obeh metod doseglo 100 % ujemanje. Z našo retrospektivno analizo smo dokazali, da lahko samostojna uporaba metode MIRU-VNTR/24 enakovredno ovrednoti izolate bacilov tuberkuloze v primerjavi z metodo RFLP in tako postane metoda izbora tipizacije bacilov tuberkuloze v Sloveniji in s tem potrdili prvo hipotezo. Metoda omogoča tipizacijo bacilov

tuberkuloze iz prvih bakterijskih kultur in s tem zelo pomembno skrajša čas od odkritja novega bolnika s tuberkulozo do končnega rezultata genotipizacije. Čas tipizacije v primerjavi z metodo RFLP in spoligotipizacije je krajši za vsaj tri tedne in rezultat genotipizacije je dostopen že v času, ko je bolnik še v bolnišnici. Genotip je sporočen epidemiološki službi hkrati z rezultatom testa občutljivosti.

Prav tako smo s prospektivno analizo dokazali, da je mogoča tudi tipizacija bacilov tuberkuloze z metodo MIRU-VNTR/24 neposredno iz svežih kliničnih vzorcev po protokolu za bakterijsko kulturo. Prvi v svetovnem merilu, smo jasno dokazali, da je neposredna tipizacija uspešnejša v primeru, ko je klinični vzorec močno mikroskopsko pozitiven. Hkrati smo prvi v svetovnem merilu dokazali, da je možna tipizacija bacilov tuberkuloze iz svežih kliničnih vzorcev še več tednov po začetku zdravljenja.

Z vsemi dosedanjimi analizami smo dokazali, da je metoda MIRU-VNTR/24 primerna, da postane metoda izbora za tipizacijo izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* v Sloveniji.

Rezultati raziskave so doprinesli k hitrejšemu poročanju rezultatov genotipizacije epidemiološki službi Registra za tuberkulozo. Genotip je določen iz zgodnje bakterijske kulture in rezultat genotipizacije sporočen skupaj s testi občutljivosti. To je časovno daleč pred rezultati ostalih dosedanjih genotipizacijskih metod in zato še toliko pomembnejši doprinos k učinkovitejšemu nadzoru nad tuberkulozo.

## 6.1 SUMMARY

The worldwide threat of tuberculosis to human health means there is an urgent need to develop new approaches to global epidemiological surveillance. The molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* has greatly improved knowledge of epidemiology of tuberculosis and enabled molecular-guided control of the disease. Genotyping indicates possible epidemiological links between patients with tuberculosis, permits detection of suspected and unsuspected outbreaks and laboratory cross-contamination, and aids follow-up on relapse cases resulting from reactivation of latent disease or exogenous re-infections.

Since 1993, the gold-standard technique for *M. tuberculosis* genotyping has been insertion sequence (IS) 6110 restriction fragment length polymorphism (IS6110 RFLP) typing. This method is based on differences in IS6110 copy numbers and genomic insertion sites per strain. IS6110 RFLP has been proven useful for conducting population-based studies of transmission of tuberculosis but also has several disadvantages, including that it is labor-intensive, requires a large amount of biomass for purifying DNA and a long wait for results, and is prone to complex fingerprint interpretation problems. Moreover, strains with fewer than six IS6110 insertion sites have a limited degree of polymorphism. Alternative PCR-based methods were therefore developed. Spoligotyping is often used, especially for discriminating strains with fewer than five IS6110 copies and recognizing some important strain lineages such as Beijing and Haarlem. Another widely used method is based on PCR interrogation of multiple genomic regions containing variable numbers of tandem repeats (VNTRs) of different classes of genetic elements, also called mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs). MIRU-VNTR typing has been internationally standardized under a 24-locus format. This method is technically flexible and considerably faster than IS6110 RFLP typing, and can be applied to DNA extracts from early mycobacterial cultures. The results are expressed as numerical codes, which are very easy to compare and exchange. The standard 24-locus-based method has been calibrated for an appropriate balance between discriminatory power for distinguishing strains of different strain lineages and clonal stability for following a given strain in transmission chains or in chronic infections. Slovenia is one of the few countries of the world where IS6110 RFLP is applied as the gold standard for genotyping *M. tuberculosis* at a nationwide level, and this has been true

since 2000. Based on this method, typical risk factors and routes of *M. tuberculosis* transmission were identified by Žolnir-Dovč et al. Alcohol abuse and homelessness were significantly associated with clustering of patient strains and were therefore recognized as the most important socio-demographic and epidemiological factors. Analysis of the largest patient strain-clusters also identified bars as important places for transmission of tuberculosis. Therefore, we strongly believe that the molecular-guided recognition of bars as the most important risk factor for transmission of tubercle bacilli was key in leading the decrease in the tuberculosis notification rate observed in Slovenia in subsequent years. The incidence of tuberculosis in Slovenia dropped from 19,1 in 2000 to 6,7 per 100,000 inhabitants in 2012.

In order to switch from IS6110 restriction fragment length polymorphism (IS6110 - RFLP) to 24-locus variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR/24) typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Slovenia, a detailed evaluation on discriminatory power and agreement with findings in a cluster investigation was performed on 569 tuberculosis cases during the period of 2007 to 2009. The level of discrimination of the two typing methods did not differ substantially: RFLP typing yielded 385 distinct patterns compared to 379 in MIRU-VNTR typing. A cluster investigation was performed for 47,2 % ( $n = 272$ ) of the cases clustered by MIRU-VNTR. For the 131 cases in 23 clusters with confirmed or presumed epidemiological links, 79 was confirmed with epidemiological data and 97,5 % was concordant with RFLP typing. For two isolates that were distinguished by MIRU-VNTR and RFLP we observed only one locus difference with MIRU-VNTR typing and by definition of clustering epidemiologically linked cases we could finally identify 100 % concordance between both methods. We conclude that VNTR typing has a discriminatory power equal to IS6110 RFLP typing in agreement with findings in a cluster investigation performed on an MIRU-VNTR-clustering-based cluster investigation. This study makes MIRU-VNTR typing a suitable method for tuberculosis surveillance systems.

In addition our prospective study confirmed that *M. tuberculosis* genotyping using the 24-locus MIRU-VNTR method can be performed directly on fresh clinical samples using standard procedures originally developed for bacterial culture. Direct typing is more

successful using early samples with high smear grades, although the nature and quality of the sample may influence the typeability.

MIRU-VNTR typing is suitable to become method of choice for typing *M. tuberculosis* complex isolates in Slovenia.

## 7 VIRI

- Aleksic E., Merker M., Cox H., Reiher B., Sekawi Z., Hearps A.C., Ryan C.E., Lee A.V., Goursaud R., Malau C., O'Connor J., Cherry C.L., Niemann S., Crowe S.M. 2013. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Kiribati. PLoS ONE, 8: e55423, doi:10.1371/journal.pone.0055423: 8 str.
- Alexander K.A., Laver P.N., Michel A.L., Williams M., van Helden P.D., Warren R.M., Gey van Pittius N.C. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerging Infectious Diseases, 16: 1296–1299
- Allix-Béguec C., Fauville-Dufaux M., Supply P. 2008a. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology, 46: 1398–1406
- Allix-Béguec C., Harmsen D., Weniger T., Supply P., Niemann S. 2008b. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Journal of Clinical Microbiology, 46: 2692–2699
- Allix-Béguec C., Supply P., Wanlin M., Bifani P., Fauville-Dufaux M. 2008c. Standardised PCR-based molecular epidemiology of tuberculosis. European Respiratory Journal, 31: 1077–1084
- Allix-Béguec C., Wahl C., Hanekom M., Nikolayevskyy V., Drobniowski F., Maeda S., Campos-Herrero I., Mokrousov I., Niemann S., Kontsevaya I., Rastogi N., Samper S., Sng L.-H., Warren R.M., Supply P. 2014. Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. Journal of Clinical Microbiology, 52: 164–172
- Allix C., Supply P., Fauville-Dufaux M. 2004. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit—variable number tandem repeat genotyping in clinical Mycobacteriological analysis. Clinical Infectious Diseases, 39: 783–789
- Allix C., Walravens K., Saegerman C., Godfroid J., Supply P., Fauville-Dufaux M. 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. Journal of Clinical Microbiology, 44: 1951–1962
- Alonso M., Herranz M., Martínez Lirola M., INDAL-TB Group, González-Rivera M., Bouza E., García de Viedma D. 2012. Real-time molecular epidemiology of tuberculosis by direct genotyping of smear-positive clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 50: 1755–1757



- Alonso-Rodríguez N., Martínez-Lirola M., Herránz M., Sanchez-Benitez M., Barroso P., INDAL-TB group, Bouza E., García de Viedma D. 2008. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiology*, 8, 34, doi: 10.1186/1471-2180-8-34: 9 str.
- Aranaz A., Liebana E., Gomez-Mampaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., Blazquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G., Domínguez L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. Nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49: 1263-1273
- Aranaz A., Cousins D., Mateos A., Domínguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1785–1789
- Barnes P.F., Cave M.D. 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 349: 1149–1156
- Bauer J., Andersen A.B., Kremer K., Miörner H. 1999. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2602–2606
- Bidovec-Stojkovič U., Seme K., Žolnir-Dovč M., Supply P. 2014. Prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* from fresh clinical samples. *PLoS ONE*, 9: e109547, doi: 10.1371/journal.pone.0109547: 10 str.
- Bidovec-Stojkovič U., Žolnir-Dovč M., Supply P. 2011. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Respiratory Medicine*, 105, Suppl. 1: S67–S73
- Biet F., Boschioli M.L., Thorel M.F., Guilloteau L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*, 36: 411–436
- Blouin Y., Hauck Y., Soler C., Fabre M., Vong R., Dehan C., Cazajous G., Massoure P.-L., Kraemer P., Jenkins A., Garnotel E., Pourcel C., Vergnaud G. 2012. Significance of the identification in the horn of Africa of an exceptionally deep branching *Mycobacterium tuberculosis* clade. *PLoS ONE*, 7: e52841, doi: 10.1371/journal.pone.0052841: 15 str.
- Bonura C., Gomgnimbou M.K., Refrégier G., Aleo A., Fasciana T., Giammanco A., Sola C., Mammina C. 2014. Molecular epidemiology of tuberculosis in Sicily, Italy: what has changed after a decade? *BMC Infectious Diseases*, 14, 602, doi: 10.1186/s12879-014-0602-4: 9 str.

- Boritsch E.C., Supply P., Honoré N., Seeman T., Stinear T.P., Brosch R. 2014. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. *Molecular Microbiology*, 93: 835–852
- Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K., Garnier T., Gutierrez C., Hewinson G., Kremer K., Parsons L.M., Pym A.S., Samper S., van Soolingen D., Cole S.T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 3684–3689
- Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L., Prodinger W.M., Gori A., Al-Hajoj S.A., Allix C., Aristimuño L., Arora J., Baumanis V., Binder L., Cafrune P., Cataldi A., Cheong S., Diel R., Ellermeier C., Evans J.T., Fauville-Dufaux M., Ferdinand S., Viedma D.G. de Garzelli C., Gazzola L., Gomes H.M., Gutierrez M.C., Hawkey P.M., Helden P.D. van Kadival G.V., Kreiswirth B.N., Kremer K., Kubin M., Kulkarni S.P., Liens B., Lillebaek T., Ly H.M., Martin C., Martin C., Mokrousov I., Narvskaja O., Ngeow Y.F., Naumann L., Niemann S., Parwati I., Rahim Z., Rasolofo-Razanamparany V., Rasolonavalona T., Rossetti M.L., Rüsç-Gerdes S., Sajduda A., Samper S., Shemyakin I.G., Singh U.B., Somoskovi A., Skuce R.A., Soolingen D. van, Streicher E.M., Suffys P.N., Tortoli E., Tracevska T., Vincent V., Victor T.C., Warren R.M., Yap S.F., Zaman K., Portaels F., Rastogi N., Sola C. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*, 6, 23, doi: 10.1186/1471-2180-6-23: 17 str.
- Brudey K., Gordon M., Moström P., Svensson L., Jonsson B., Sola C., Ridell M., Rastogi N. 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in western Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3046–3051
- Cáceres O., Rastogi N., Bartra C., Couvin D., Galarza M., Asencios L., Mendoza-Ticona A. 2014. Characterization of the genetic diversity of extensively-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients in Peru. *PLoS ONE*, 9: e112789, doi: 10.1371/journal.pone.0112789: 22 str.
- Christianson S., Wolfe J., Orr P., Karlowsky J., Levett P.N., Horsman G.B., Thibert L., Tang P., Sharma M.K. 2010. Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Canada. *Tuberculosis (Edinb)*, 90: 31–38
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393: 537–544

- Collins D.M., Lisle G.V. 1984. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of General Microbiology*, 130: 1019-1021
- Corbett E.L., Watt C.J., Walker N., Maher D., Williams B.G., Raviglione M.C., Dye C. 2003. The growing burden of tuberculosis: Global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of Internal Medicine*, 163: 1009–1021
- Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodríguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1305–1314
- Cowan L.S., Mosher L., Diem L., Massey J.P., Crawford J.T. 2002. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1592-1602
- Crawford J.T., Bates J.H. 1985. Phage typing of the *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex. A study of strains of diverse geographic and host origin. *American Review of Respiratory Disease*, 132: 386–389
- Dale J.W. 1995. Mobile genetic elements in mycobacteria. *European Respiratory Journal*, Supplement, 20: 633s–648s
- Dale J.W., Brittain D., Cataldi A.A., Cousins D., Crawford J.T., Driscoll J., Heersma H., Lillebaek T., Quitugua T., Rastogi N., Skuce R.A., Sola C., van Soolingen D., Vincent V. 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature [The Language of Our Science]. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 5: 216–219
- David S., Ribeiro D.R., Antunes A., Portugal C., Sancho L., de Sousa J.G. 2007. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*, 7: 609–617
- De Beer J.L., Kremer K., Ködmön C., Supply P., van Soolingen D., Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis 2009. 2012. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 50: 662–669
- De Beer J.L., van Ingen J., de Vries G., Erkens C., Sebek M., Mulder A., Slot R., van den Brandt A.-M., Enaimi M., Kremer K., Supply P., van Soolingen D. 2013. Comparative Study of IS6110 restriction fragment length polymorphism and

- variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 51: 1193–1198
- De Beer J.L., Kodmon C., van der Werf M.J., van Ingen J., van Soolingen D. 2014a. ECDC MDR-TB Molecular Surveillance Project Participants, Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011. 2014. *Euro Surveillance* 19, 11: 9 str. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleID=20742>
- De Beer J.L., Ködmön C., van Ingen J., Supply P., van Soolingen D., Global Network for Molecular Surveillance of Tuberculosis 2010. 2014b. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 18: 594–600
- De Beer J.L., Akkerman O.W., Schürch A.C., Mulder A., van der Werf T.S., van der Zanden A.G.M., van Ingen J., van Soolingen D. 2014c. Optimization of standard in-house 24-locus variable-number tandem-repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 1338–1342
- Demay C., Liens B., Burguière T., Hill V., Couvin D., Millet J., Mokrousov I., Sola C., Zozio T., Rastogi N. 2012. SITVITWEB - a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 755–766
- Denholm J.T., McBryde E.S. 2010. The use of anti-tuberculosis therapy for latent TB infection. *Journal of Infection and Drug Resistance*, 3: 63-72
- Diel R., Loddenkemper R., Nienhaus A. 2012. Predictive value of interferon –  $\gamma$  release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to disease state. *Chest*, 142: 63-75
- Dye C., Williams B.G. 2008. Eliminating human tuberculosis in the twenty-first century. *Journal of The Royal Society Interface*, 5: 653-662
- ECDC. 2003. Surveillance of Tuberculosis in Europe - EuroTB. Report on tuberculosis cases notified in 2000. ECDC. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 120 str.
- ECDC. 2010. Tuberculosis surveillance in Europe. Surveillance report 2008. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 124 str.
- ECDC. 2014. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. Surveillance report 2012. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 203 str.

- ECDC. 2011. ERLN-TB Project. Mastering the basics of TB control. Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control: 101 str.
- Filliol I., Driscoll J.R., Van Soolingen D., Kreiswirth B.N., Kremer K., Valétudie G., Anh D.D., Barlow R., Banerjee D., Bifani P.J., Brudey K., Cataldi A., Cooksey R.C., Cousins D.V., Dale J.W., Dellagostin O.A., Drobniewski F., Engelmann G., Ferdinand S., Gascoyne-Binzi D., Gordon M., Gutierrez M.C., Haas W.H., Heersma H., Källenius G., Kassa-Kelembho E., Koivula T., Ly H.M., Makristathis A., Mammina C., Martin G., Moström P., Mokrousov I., Narbonne V., Narvskaya O., Nastasi A., Niobe-Eyangoh S.N., Pape J.W., Rasolofa-Razanamparany V., Ridell M., Rossetti M.L., Stauffer F., Suffys P.N., Takiff H., Texier-Maugein J., Vincent V., De Waard J.H., Sola C., Rastogi N. 2002. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 1347–1349
- Filliol I., Driscoll J.R., van Soolingen D., Kreiswirth B.N., Kremer K., Valétudie G., Dang D.A., Barlow R., Banerjee D., Bifani P.J., Brudey K., Cataldi A., Cooksey R.C., Cousins D.V., Dale J.W., Dellagostin O.A., Drobniewski F., Engelmann G., Ferdinand S., Gascoyne-Binzi D., Gordon M., Gutierrez M.C., Haas W.H., Heersma H., Kassa-Kelembho E., Ho M.L., Makristathis A., Mammina C., Martin G., Moström P., Mokrousov I., Narbonne V., Narvskaya O., Nastasi A., Niobe-Eyangoh S.N., Pape J.W., Rasolofa-Razanamparany V., Ridell M., Rossetti M.L., Stauffer F., Suffys P.N., Takiff H., Texier-Maugein J., Vincent V., de Waard J.H., Sola C., Rastogi N. 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1963–1970
- Frothingham R., Meeker-O’Connell W.A. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 144: 1189–1196
- Galagan J.E. 2014. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics*, 15: 307–320
- Gehre F., Otu J., DeRiemer K., de Sessions P.F., Hibberd M.L., Mulders W., Corrah T., de Jong B.C., Antonio M. 2013. Deciphering the growth behaviour of *Mycobacterium africanum*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7: e2220, doi: 10.1371/journal.pntd.0002220: 10 str.
- Ghebremichael S., Groenheit R., Pennhag A., Koivula T., Andersson E., Bruchfeld J., Hoffner S., Romanus V., Källenius G. 2010. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing genotype does not spread in Sweden. *PLoS ONE*, 5: e10893, doi: 10.1371/journal.pone.0010893: 10 str.
- Gori A., Bandera A., Marchetti G., Esposti A.D., Catozzi L., Nardi G.P., Gazzola L., Ferrario G., van Embden J.D.A., van Soolingen D., Moroni M., Franzetti F. 2005.

- Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 1242–1248
- Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D., Young D.B., Shaw R.J. 1997. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 647–651
- Green E.P., Tizard M.L., Moss M.T., Thompson J., Winterbourne D.J., McFadden J.J., Hermon-Taylor J. 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research*, 17, 22: 9063-9073
- Guernier V., Sola C., Brudey K., Guégan J.-F., Rastogi N. 2008. Use of cluster-graphs from spoligotyping data to study genotype similarities and a comparison of three indices to quantify recent tuberculosis transmission among culture positive cases in French Guiana during a eight year period. *BMC Infectious Diseases*, 8: 46, doi: 10.1186/1471-2334-8-46: 11 str.
- Haas W.H., Butler W.R., Woodley C.L., Crawford J.T. 1993. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1293-1298
- Heersma H.F., Kremer K., van Embden J.D. 1998. Computer analysis of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Molecular Biology*, 101: 395–422
- Hermans P.W., van Soolingen D., van Embden J.D. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodnae*. *Journal of Bacteriology*, 174: 4157–4165
- Hill V., Zozio T., Sadikalay S., Viegas S., Streit E., Kallenius G., Rastogi N. 2012. MLVA Based Classification of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages for a robust phylogeographic snapshot of its worldwide molecular diversity. *PLoS ONE*, 7: e41991, doi: 10.1371/journal.pone/0041991: 16 str.
- Hunter P.R., Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 2465–2466
- Jagielski T., van Ingen J., Rastogi N., Dziadek J., Mazur P., Bielecki J. 2014. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacteria*. *BioMed Research International* 2014, e645802: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/645802>: 21 str.
- Jiao W.W., Mokrousov I., Sun G.Z., Guo Y.J., Vyazovaya A., Narvskaya O., Shen A.D.

2008. Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing genotype isolates from Beijing, China. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1045–1049
- Jonsson J., Hoffner S., Berggren I., Bruchfeld J., Ghebremichael S., Pennhag A., Groenheit R. 2014. Comparison between RFLP and MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Stockholm 2009 to 2011. *PLoS ONE*, 9, 4: e95159, doi: 10.1371/journal.pone/0095159: 6 str.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 907–914
- Kipar A., Burthe S.J., Hetzel U., Rokia M.A., Telfer S., Lambin X., Birtles R.J., Begon M., Bennett M. 2014. *Mycobacterium microti* tuberculosis in its maintenance host, the field vole (*Microtus agrestis*): characterization of the disease and possible routes of transmission. *Veterinary Pathology*, 51: 903-914
- Koeck J.L., Fabre M., Simon F., Daffe M., Garnotel E., Matan A.B., Gerôme P., Bernatas J.J., Buisson Y., Pourcel C. 2010. Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli '*Mycobacterium canettii*' infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 1013-1019
- Kohl T.A., Diel R., Harmsen D., Rothgänger J., Walter K.M., Merker M., Weniger T., Niemann S. 2014. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 2479–2486
- Köser C.U., Feuerriegel S., Summers D.K., Archer J.A.C., Niemann S. 2012. Importance of the Genetic Diversity within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex for the development of novel antibiotics and diagnostic tests of drug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 6080–6087
- Košnik M., Mrevlje F., Štajer D., Černelč P., Koželj M. (ur.) 2011. *Interna medicina*. 4. izd. Ljubljana, Littera picta: 434-445
- Kremer K., Au B.K.Y., Yip P.C.W., Skuce R., Supply P., Kam K.M., van Soolingen D. 2005. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 314–320
- Kremer K., Glynn J.R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N., Bifani P.J., van Soolingen D. 2004. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4040–4049

- Kunze Z.M., Portaels F., McFadden J.J. 1992. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2366–2372
- Kwara A., Schiro R., Cowan L.S., Hyslop N.E., Wiser M.F., Harrison S.R., Kissinger P., Diem L., Crawford J.T. 2003. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2683-2685
- Marais B.J., Victor T.C., Hesselning A.C., Barnard M., Jordaan A., Brittle W., Reuter H., Beyers N., van Helden P.D., Warren R.M., Schaaf H.S. 2006. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3539–3543
- Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Gicquel B., Tibayrenc M., Locht C., Supply P. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 1901–1906
- Menzies D. 2013. Molecular methods for tuberculosis trials: time for whole-genome sequencing? *Lancet Respiratory Medicine*, 1: 759–761
- Merker M., Kohl T.A., Roetzer A., Truebe L., Richter E., Rüscher-Gerdes S., Fattorini L., Oggioni M.R., Cox H., Varaine F., Niemann S. 2013. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. *PLoS ONE*, 8: e82551, doi: 10.1371/journal.pone.0082551: 11 str.
- Migliori G.B., Loddenkemper R., Blasi F., Raviglione M.C. 2007. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? *European Respiratory Journal*, 29: 423–427
- Mokrousov I., Valcheva V., Sovhozova N., Aldashev A., Rastogi N., Isakova J. 2009. Penitentiary population of *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyzstan: exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 1400–1405
- Program obvladovanja tuberkuloze. 2011. Golnik. Klinika Golnik: 35 str.  
[http://www.klinika-golnik.si/uploads/klinika-golnik-files/program\\_obvladovanja\\_tb.pdf](http://www.klinika-golnik.si/uploads/klinika-golnik-files/program_obvladovanja_tb.pdf)  
(nov., 2014).
- Niemann S., Richter E., Rüscher-Gerdes S. 2000. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 152-157





- tuberculosis* isolates by spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1525–1528
- Rastogi N., Legrand E., Sola C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Scientific and Technical Review*, 20: 21–54
- Register za tuberkulozo. 2014a. Incidenca tuberkuloze v Sloveniji od leta 1996 do leta 2013. Golnik, Klinika Golnik (interno gradivo).
- Register za tuberkulozo. 2014b. Geografska razporeditev bolnikov s tuberkulozo v Sloveniji v letih 2006-2009. Golnik, Klinika Golnik (interno gradivo).
- Reisig F., Kremer K., Amthor B., van Soolingen D., Haas W.H. 2005. Fast ligation-mediated PCR, a fast and reliable method for IS6110-based typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5622–5627
- Rieder H.L., Chonde T.M., Myking H., Urbanczik R., Laszlo A., Kim S.J., Van Deun A., Trebucq A. 1998. Minimum requirements, role and operation in a low-income county. Paris, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 110 str.
- Roetzer A., Diel R., Kohl T.A., Rückert C., Nübel U., Blom J., Wirth T., Jaenicke S., Schuback S., Rüscher-Gerdes S., Supply P., Kalinowski J., Niemann S. 2013. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* Outbreak: A longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Medicine*, 10: e1001387, doi: 10.1371/journal.pmed.1001387: 12 str.
- Roetzer A., Schuback S., Diel R., Gasau F., Ubben T., Nauta A. di, Richter E., Rüscher-Gerdes S., Niemann S. 2011. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 4173–4178
- Roring S., Scott A., Brittain D., Walker I., Hewinson G., Neill S., Skuce R. 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2126–2133
- Rosenberg N.A., Pritchard J.K., Weber J.L., Cann H.M., Kidd K.K., Zhivotovsky L.A., Feldman M.W. 2002. Genetic structure of human populations. *Science*, 298: 2381–2385
- Sandgren A., Strong M., Muthukrishnan P., Weiner B.K., Church G.M., Murray M.B. 2009. Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Medicine*, 6: e1000002, doi: 10.1371/journal.pmed.1000002.sd001: 5 str.
- Savine E., Warren R.M., van der Spuy G.D., Beyers N., van Helden P.D., Locht C., Supply P. 2002. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed

- repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 4561–4566
- Schürch A.C., Kremer K., Kiers A., Daviena O., Boeree M.J., Siezen R.J., Smith N.H., van Soolingen D. 2010. The tempo and mode of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale. *Infection, Genetics and Evolution*, 10: 108–114
- Schürch A.C., van Soolingen D. 2012. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 602–609
- Sebban M., Mokrousov I., Rastogi N., Sola C. 2002. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics*, 18: 235–243
- Shamputa I.C., Lee J., Allix-Beguec C., Cho E.-J., Lee J., Rajan V., Lee E.G., Min J.H., Carroll M.W., Goldfeder L.C., Kim J.H., Kang H.S., Hwang S., Eum S.-Y., Park S.K., Lee H., Supply P., Cho S.-N., Via L.E., Barry C.E. 2010. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a tertiary care Tuberculosis Hospital in South Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 387–394
- Shinnick T.M., Good R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology*, 13: 884-901
- Singh S.P., Salamon H., Lahti C.J., Farid-Moyer M., Small P.M. 1999. Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1927-1931
- Skuce R.A., McCorry T.P., McCarroll J.F., Roring S.M.M., Scott A.N., Brittain D., Hughes S.L., Hewinson R.G., Neill S.D. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 148: 519–528
- Sloot R., Borgdorff M.W., de Beer, J.L. van Ingen J., Supply P., van Soolingen D. 2013. Clustering of tuberculosis cases based on variable-number tandem-repeat typing in relation to the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, 51: 2427–2431
- Soini H., Pan X., Amin A., Graviss E.A., Siddiqui A., Musser J.M. 2000. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 669–676
- Sola C. 1999. Tuberculosis in the Caribbean: Using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 404-414

- Sola C., Ferdinand S., Mammina C., Nastasi A., Rastogi N. 2001a. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1559–1565
- Sola C., Filliol I., Gutierrez M.C., Mokrousov I., Vincent V., Rastogi N. 2001b. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 390–396
- Sola C., Filliol I., Legrand E., Lesjean S., Locht C., Supply P., Rastogi N. 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 3: 125–133
- Sola C., Horgen L., Maïsetti J., Devallois A., Goh K.S., Rastogi N. 1998. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 1122–1124
- Streicher E.M., Victor T.C., Spuy G. van der, Sola C., Rastogi N., Helden P.D. van, Warren R.M. 2007. Spoligotype signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 237–240
- Stucki D., Ballif M., Bodmer T., Coscolla M., Maurer A.-M., Droz S., Butz C., Borrell S., Längle C., Feldmann J., Furrer H., Mordasini C., Helbling P., Rieder H.L., Egger M., Gagneux S., Fenner L. 2014. Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strain-specific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing. *Journal of Infectious Diseases*, 211, 8: 1306-1316
- Sun G., Luo T., Yang C., Dong X., Li J., Zhu Y., Zheng H., Tian W., Wang S., Barry C.E., Mei J., Gao Q. 2012. Dynamic population changes in *Mycobacterium tuberculosis* during acquisition and fixation of drug resistance in patients. *Journal of Infectious Diseases*, 206: 1724–1733
- Supply P., Magdalena J., Himpens S., Locht C. 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology*, 26: 991–1003
- Supply P., Mazars E., Lesjean S., Vincent V., Gicquel B., Locht C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*, 36: 762–771
- Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soolingen D., Locht C. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3563–3571

- Supply P., Warren R.M., Bañuls A.-L., Lesjean S., Van Der Spuy G.D., Lewis L.-A., Tibayrenc M., Van Helden P.D., Locht C. 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Molecular Microbiology*, 47: 529–538
- Supply P. 2005. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical guide. Lille, Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille: 73 str.
- Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsche-Gerdes S., Willery E., Savine E., Haas P. de, Deutekom H. van, Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Locht C., Soolingen D. van. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 4498–4510
- Thierry D., Brisson-Noël A., Vincent-Lévy-Frébault V., Nguyen S., Guesdon J.L., Gicquel B. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2668–2673
- Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H., Gicquel B., Guesdon J.L. 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Research*, 18: 188-188
- Tortoli E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48: 159–178
- Tortoli E. 2014. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27: 727–752
- Vadwai V., Shetty A., Supply P., Rodrigues C. 2012. Evaluation of 24-locus MIRU-VNTR in extrapulmonary specimens: study from a tertiary centre in Mumbai. *Tuberculosis (Edinb)*, 92: 264–272
- Valcheva V., Mokrousov I., Narvskaya O., Rastogi N., Markova N. 2008. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 3005–3011
- Van der Zanden A.G.M., Kremer K., Schouls L.M., Caimi K., Cataldi A., Hulleman A., Nagelkerke N.J.D., van Soolingen D. 2002. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 4628–4639

- Van Deutekom H., Supply P., Haas P.E.W. de, Willery E., Hoijng S.P., Locht C., Coutinho R.A., Soolingen D. van. 2005. 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4473–4479
- Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 406–4039
- Van Embden J.D., van Gorkom T., Kremer K., Jansen R., van Der Zeijst B.A., Schouls L.M. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182: 2393–2401
- Van Ingen J., Brosch R., van Soolingen D. 2013. Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerging Infectious Diseases*, 19: 521–522
- Van Ingen J., Rahim Z., Mulder A., Boeree M.J., Simeone R., Brosch R., van Soolingen D. 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging Infectious Diseases*, 18: 653–655
- Van Soolingen D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*, 249: 1–26
- Van Soolingen D. 2014. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* as an epidemiological marker. *Lancet Respiratory Medicine*, 2: 251–252
- Van Soolingen D., Borgdorff M.W., Haas P.E.W. de, Sebek M.M.G.G., Veen J., Dessens M., Kremer K., van Embden J.D.A. 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: A nationwide study from 1993 through 1997. *Journal of Infectious Diseases*, 180: 726–736
- Van Soolingen D., de Haas P.E., Hermans P.W., Groenen P.M., van Embden J.D. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1987–1995
- Van Soolingen D., de Haas P.E., Hermans P.W., van Embden J.D. 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Enzymology*, 235: 196–205
- Van Soolingen D., de Hass P., Kremer K. 2002. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of *Mycobacteria*. Technical guide. Bilthoven, National Institute of Public Health and Environmental Protection: 52 str.

- Van Soolingen D., Hermans P.W., de Haas P.E., Soll D.R., van Embden J.D. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 2578–2586
- Van Soolingen D., Hermans P.W., de Haas P.E., van Embden J.D. 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1772–1777
- Varma-Basil M., Kumar S., Arora J., Angrup A., Zozio T., Banavaliker J.N., Singh U.B., Rastogi N., Bose M. 2011. Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Delhi, North India. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106: 524–535
- Velayati A.A., Masjedi M.R., Farnia P., Tabarsi P., Ghanavi J., Ziazarifi A.H., Hoffner S.E. 2009. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*, 136: 420–425
- Vincent V., Brown-Elliott B.A., Jost K.C. Jr, Wallace R.J. Jr, n.d. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and genotypic identification. V: Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds.). Washington D.C, American Society for Microbiology Press: 560–584
- Walker T.M., Ip C.L., Harrell R.H., Evans J.T., Kapatai G., Dediccoat M.J., Eyre D.W., Wilson D.J., Hawkey P.M., Crook D.W., Parkhill J., Harris D., Walker A.S., Bowden R., Monk P., Smith E.G., Peto T.E. 2013. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infectious Diseases*, 13: 137–146
- Walker T.M., Kohl T.A., Omar S.V., Hedge J., Ojo Elias C., Bradley P., Iqbal Z., Feuerriegel S., Niehaus K.E., Wilson D.J., Clifton D.A., Kapatai G., Ip C.L.C., Bowden R., Drobniowski F.A., Allix-Béguec C., Gaudin C., Parkhill J., Diel R., Supply P., Crook D.W., Smith E.G., Walker A.S., Ismail N., Niemann S., Peto T.E.A., and the Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group. 2015. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infectious Diseases*, 15, 10: 1193-1202
- Wayne L.G., Good R.C., Krichevsky M.I., Blacklock Z., David H.L., Dawson D., Gross W., Hawkins J., Levy-Frebault V.V., McManus C., Portaels F., Rüscher-Gerdes S., Schröder K.H., Silcox V.A., Tsukamura M., Van den Breen L., Yakus M.A. 1991. Fourth report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *International*

Journal of Systematic and Evolutionary, 41, 4: 463-472

- Weniger T., Krawczyk J., Supply P., Niemann S., Harmsen D. 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Research*, 38: W326–W331
- WHO 1994. TB - A global emergency. WHO report on TB epidemic. WHO/TB/94.177. 1994. Geneva, World Health Organization: 32 str.
- WHO 2008a. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth global report. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2002-2007. 2008. Geneva, World Health Organization: 120 str.
- WHO 2008b. Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing : WHO report 2008. "WHO/HTM/TB/2008.393,". 2008. Geneva, World Health Organization: 294 str.
- WHO 2014. Global tuberculosis report. WHO report 2014. "WHO/HTM/TB/2014.08,". 2014. Geneva, World Health Organization: 171 str.
- Wirth T., Hildebrand F., Allix-Béguec C., Wöbeling F., Kubica T., Kremer K., van Soolingen D., Rüsche-Gerdes S., Locht C., Brisse S., Meyer A., Supply P., Niemann S. 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathogens*, 4: e1000160, doi: 10.1371/journal.ppat.1000160: 10 str.
- Zhang Y., Mazurek G.H., Cave M.D., Eisenach K.D., Pang Y., Murphy D.T., Wallace R.J. 1992. DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1551-1556
- Zhang J., Abadia E., Refregier G., Tafaj S., Boschirola M.L., Guillard B., Andremont A., Ruimy R., Sola C. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of "spoligotyping" with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 285–294
- Zozio T., Allix C., Gunal S., Saribas Z., Alp A., Durmaz R., Fauville-Dufaux M., Rastogi N., Sola C. 2005. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in two cities of Turkey: Description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. *BMC Microbiology*, 5, 44, doi: 10.1186/1471-2180-5-44: 9 str.
- Žolnir-Dovč M. 2004. Molekularno epidemiološka raziskava izolatov bakterije *M. tuberculosis* v Sloveniji. Doktorska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 95 str.
- Žolnir-Dovč M., Poljak M., Eržen D., Šorli J. 2003. Molecular epidemiology of



tuberculosis in Slovenia: results of a one-year (2001) nation-wide study.  
Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 35: 863–868

## ZAHVALA

Hvala dr. Manci Žolnir-Dovč, univ. dipl. biol., za vso pomoč in strokovne nasvete pri nastanku raziskovalnega dela.

Iskrena hvala moji mentorici prof. dr. Katji Seme, dr. med., za vso strokovno pomoč, trud in podporo. Hvala za vse vzpodbudne besede in pohvale iz katerih sem lahko črpala navdih in motivacijo za naprej.

Hvala tudi prof. dr. Mariu Poljaku, dr. med., prof. dr. Darji Žgur-Bertok, univ. dipl. biol. in znan. svet. dr. Matjažu Ocepku, dr. vet. med., ki so mi s svojimi strokovnimi in praktičnimi nasveti pomagali do strokovno popolnejšega dela.

Zahvaljujem se Univerzi v Ljubljani in Kliniki Golnik za dodatno finančno podporo pri izvedbi doktorske naloge.

Hvala vsem sodelavcem na Kliniki Golnik, ki so kakorkoli doprinesli k nastanku doktorske disertacije. Še posebej hvala Matiji Rijavcu in Nataši Fajfar, za njuno nesebično pomoč v vseh oblikah. Hvala tudi vsem sodelavkam v Laboratoriju za mikobakterije, predvsem Francki, Jasni, Marički in Nadi, ki so me vsa ta leta spremljale, mi pri delu pomagale in me bodrile za naprej.

Hvala Petri Svetina, Katji Pivk, Andražju Jaklju in Urški Hribar za pomoč pri zbiranju in analizi podatkov, ki so pomembno oblikovali doktorsko disertacijo.

Hvala vsem mojim najbližjim.

Največja hvala mojim staršem, ki mi v življenju ves čas stojijo ob strani, me učijo pravih vrednot in mi s svojim zgledom vedno pokažejo pravo pot.

Najljubša hvala tudi moji Katji in Neži, ki sta skozi otroške oči spremljali nastanek naloge in mi s skoraj odraslimi pripombami prikazali popolnoma drugačen pogled na moje delo. Hvala za vsak objem, skrb, poljubček in nasmeh.

Nenazadnje najlepša hvala tudi Sašotu, ki me spremlja skozi vso mojo raziskovalno pot že od srednješolskih let. Hvala za vse modre besede, podporo in potrpljenje skozi vsa ta leta.

Hvala vsem, ki mojemu življenju dajete smisel in veselje.

## PRILOGE

Priloga A: Pravilnik o postopkih genotipizacije izolatov bacilov *M. tuberculosis* z vidika zagotovitve varne obdelave podatkov.



UPRAVA

### PRAVILNIK O POSTOPKIH GENOTIPIZACIJE SEVOV BACILOV *M. TUBERCULOSIS* Z VIDIKA ZAGOTOVITVE VARNE OBDELAVE PODATKOV

SOP 801-46: 1/20.2.2013

Na podlagi 24. člena Statuta Bolnišnice Golnik – Kliničnega oddelka za pljučne bolezni in alergijo izdaja direktor

#### PRAVILNIK O POSTOPKIH GENOTIPIZACIJE SEVOV BACILOV *M. TUBERCULOSIS* Z VIDIKA ZAGOTOVITVE VARNE OBDELAVE PODATKOV

##### 1. člen

S tem pravilnikom se določa analiza, identifikacija, hramba rezultatov genotipizacije sevov bacilov *M. tuberculosis* (v nadaljevanju: fingerprinting) ter postopki in ukrepi za zavarovanje osebnih in drugih podatkov, ki nastanejo v postopku fingerprintinga z namenom, da se prepreči slučajno ali namerno nepooblaščen uničenje podatkov, njihovo spremembo ali izgubo, kakor tudi nepooblaščen dostop, obdelava, uporaba ali posredovanje osebnih in drugih podatkov, ki nastanejo v postopku fingerprintinga.

##### 2. člen

Postopki in rezultati fingerprintinga so namenjeni izključno za odkrivanje (mikro)epidemij, omejitev širjenja, načrtovanja preventivnih ukrepov proti širjenju tuberkuloze (v nadaljevanju TB) ter načrtovanje drugih ukrepov obvladovanja TB v Republiki Sloveniji, ki jih opredeljuje Nacionalni program za TB (v nadaljevanju NPTB), načrtuje, izvaja in nadzoruje Register za tuberkulozo (na nadaljevanju: register).

Rezultati fingerprintinga predstavljajo poslovno skrivnost Klinike Golnik in ne predstavljajo zdravstvene dokumentacije pacienta, zato se jih ne sporoča pacientom, izbranim osebnim zdravnikom in izbranim specialistom.

##### 3. člen

Direktor pooblasti eno osebo v Laboratoriju za mikobakterije (v nadaljevanju: laboratorij) in eno osebo iz registra, ki bosta odgovorni za koordiniranje postopkov fingerprintinga na svojem področju.

Naloge in odgovornosti pooblaščenih oseb:

- nadzor nad rednim izvajanjem postopkov fingerprintinga (pooblaščen oseba iz laboratorija)
- nadzor nad rednim posredovanjem rezultatov v register (pooblaščen oseba iz laboratorija)
- redno zbiranje in shranjevanje rezultatov fingerprintinga (pooblaščen oseba iz registra)
- analiza rezultatov in ugotavljanje mikroepidemij (pooblaščen oseba iz registra)
- sestava skupini (pooblaščen oseba iz registra)

Delo pooblaščenih oseb v Registru za TB in v Laboratoriju za mikobakterije nadzirata vodji omenjenih enot, ki hkrati skrbita za nadzor kakovosti postopkov fingerprintinga.

##### 4. člen

#### POSTOPEK PRED FINGERPRINTINGOM

Laboratorij ugotovi prisotnost bacilov *M. tuberculosis* v kužnini in rezultate analize na obrazcu DEL 4 posreduje registru.

#### POSTOPEK FINGERPRINTINGA

Postopek fingerprintinga se izvede v laboratoriju na vsakem prvem izolatu bacilov *M. tuberculosis* pri posameznem bolniku. Rezultate fingerprintinga laboratorij posreduje izključno pooblaščenim osebam registra.

V kolikor pooblaščen oseba registra na podlagi rezultatov fingerprintinga in znanih epidemioloških podatkov, zazna sum (mikro)epidemije v določenem okolju, lahko za potrebe ugotavljanja obsega in omejitve mikroepidemije, skliče posebno skupino strokovnjakov.

Naloge posebne skupine:

- potrditev obstoja (mikro)epidemije
- ugotovitev obsega (mikro)epidemije
- sprejem ukrepov za omejitev širjenja TB
- organizacija izvedbe pregledov kontaktov (oseb, ki so bile v stiku z bolniki s TB)
- ureditev zdravljenja LTBO.

Posebno skupino sestavljajo osebe, ki jih po prostem preudarku, vezano na strokovno usposobljenosti posameznika in potrebe za omejitev širjenja TB, določi pooblaščen oseba registra. Praviloma so to: vodja NPTB, vodja registra, vodja laboratorija, pooblaščen oseba iz registra, predstavniki lokalne ustanove in področni pulmolog, kjer je zaznan sum (mikro)epidemije, ipd.

#### 5. člen

Vsi podatki, pridobljeni s fingerprintingom se analizirajo, hranijo in obdelujejo le v registru.

Vsi podatki, pridobljeni s fingerprintingom se shranjujejo na način, da se prepreči dostop nepooblaščenim osebam in tako, da se beležijo vsakokratni vpogledi v podatke.

Analiza, hramba, obdelava in vsakršno drugačno razpolaganje z rezultati fingerprintinga, ki je v nasprotju s pravili tega pravilnika predstavlja hujšo kršitev delovnih obveznosti in je lahko razlog za redno ali izredno odpoved pogodbe o zaposlitvi.

#### 6. člen

Ta pravilnik in njegove spremembe ter dopolnitve sprejme direktor Klinike Golnik.

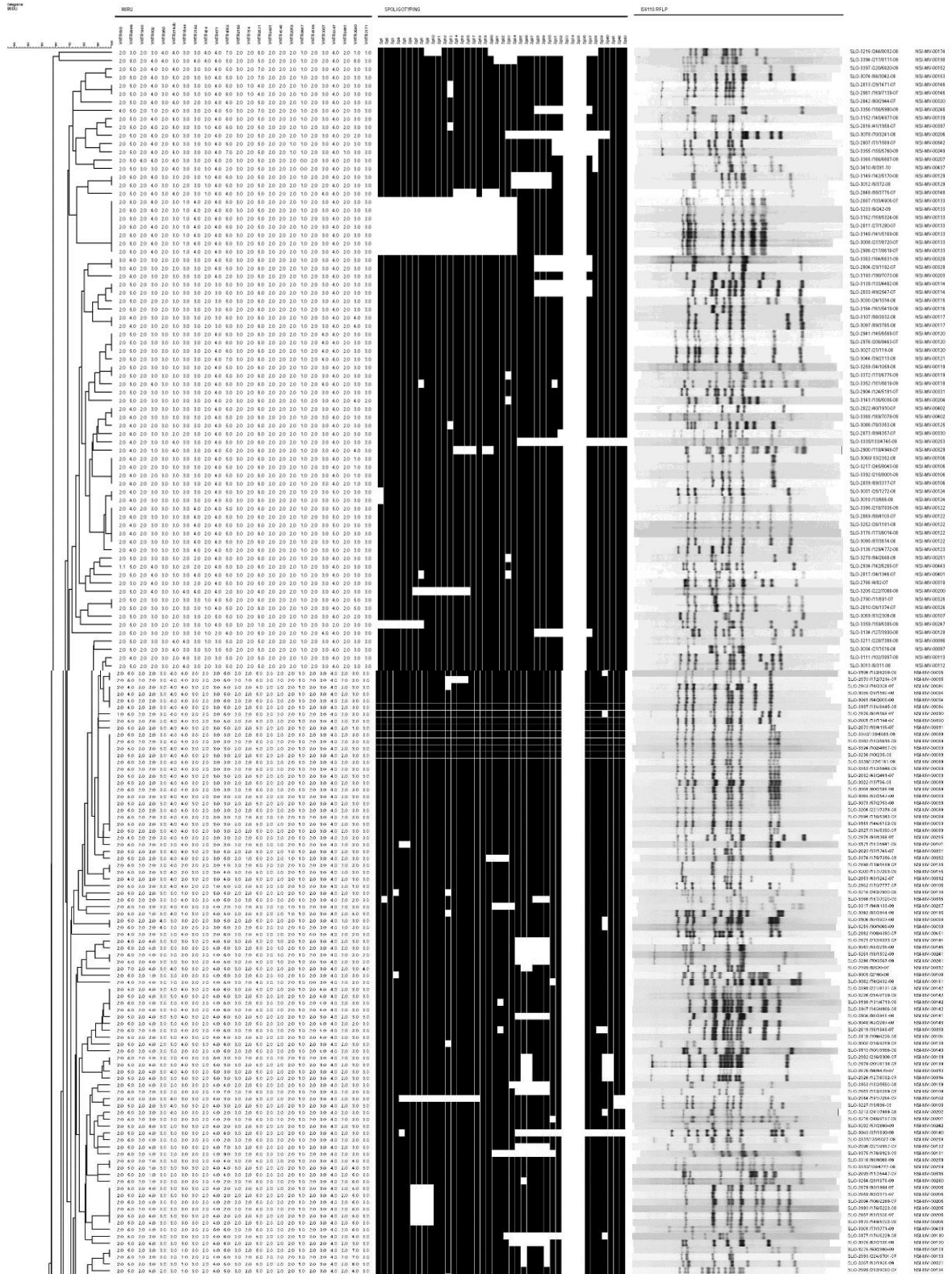
Pravilnik prične veljati, ko se objavi na intranetu in na oglasnih deskah.

Golnik, dne 13. 2. 2013



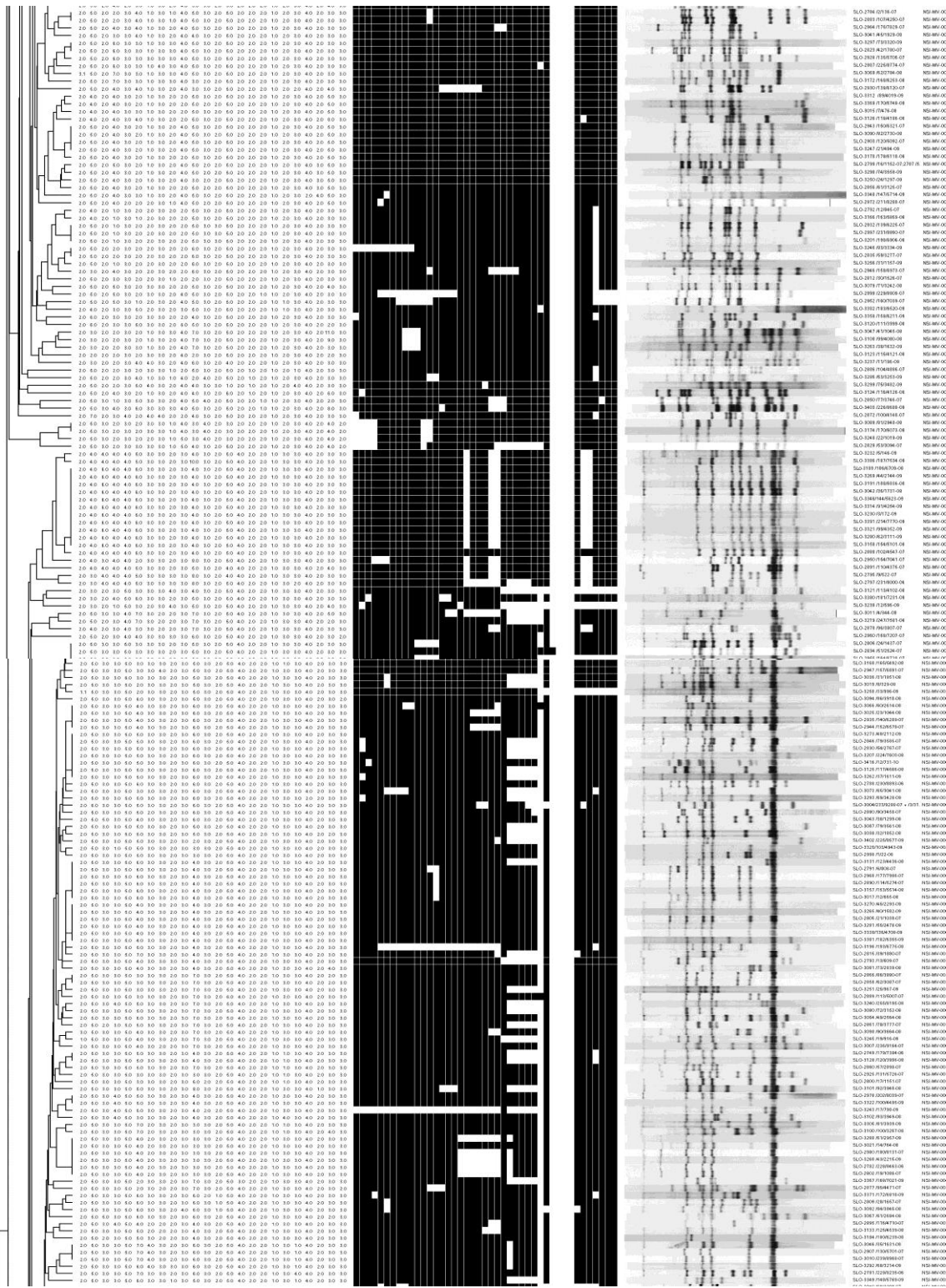
izr. prof. Mitja Košnik, dr. med., spec.  
Direktor Klinike Golnik

Priloga B: Analiza 576 slovenskih izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* (triletna analiza) z metodo MIRU-VNTR/24.



Se nadaljuje

Nadaljevanje priloge B: Analiza 576 slovenskih izolatov iz sklopa *M. tuberculosis* (triletna analiza)  
z metodo MIRU-VNTR/24.



Se nadaljuje





