

\*Monika Kozińska, Zofia Zwolska, Ewa Augustynowicz-Kopeć

## Transmisja gruźlicy lekoopornej wśród osób blisko spokrewnionych<sup>1)</sup>

## Transmission of drug-resistant TB among family members

Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

### Streszczenie

**Wstęp.** Gruźlica jest chorobą zakaźną przenoszoną głównie drogą kropelkową, co determinuje łatwość jej transmisji. W nadzorze nad rozprzestrzenianiem się choroby najważniejsze jest wczesne wykrycie chorych prątkujących, wdrożenie właściwego leczenia oraz prześledzenie dróg transmisji zakażenia. Wieloletnie badania nad transmisją gruźlicy w otoczeniu chorych wskazują, że ryzyko zakażenia osób pozostających w bliskim kontakcie, a zwłaszcza członków rodzin, jest bardzo wysokie. Z tego względu dochodzenie epidemiologiczne powinno objąć wszystkie osoby, które miały kontakt z chorym, a pod szczególnym nadzorem powinny znaleźć się te osoby, w otoczeniu których stwierdzono chorych z gruźlicą lekooporną.

**Materiał i metody.** Przedmiotem badań były lekooporne szczepy *M. tuberculosis* complex wyizolowane od 10 chorych będących członkami 4 rodzin. W jednej z rodzin chorował ojciec i troje dorosłych dzieci, a w pozostałych trzech rodzinach zidentyfikowano po dwóch chorych – matkę i 12-letniego syna, matkę i dorosłą córkę oraz małżeństwo pochodzące z Czechni. W Zakładzie Mikrobiologii IGiChP zweryfikowano wzory lekooporności szczepów oraz zbadano ich pokrewieństwo genetyczne. W analizie molekularnej zastosowano 3 metody typowania: spoligotyping, IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR oraz MIRU-VNTR.

**Wyniki.** Wśród badanych szczepów wyhodowanych od 10 chorych, zidentyfikowano 4 szczepy odporne na SM, 2 odporne na INH, 2 odporne na INH+SM i 2 odporne na INH+RMP+SM+EMB+OFL (typ oporności pre-XDR). Analiza wzorów DNA wskazała na pokrewieństwo genetyczne szczepów izolowanych od chorych w obrębie każdej z rodzin.

**Wnioski.** Obserwacja identycznych wzorów lekooporności oraz takich samych profili DNA wśród szczepów izolowanych od członków rodzin potwierdziły zjawisko transmisji gruźlicy lekoopornej pomiędzy chorymi.

Słowa kluczowe: gruźlica lekooporna, transmisja, molekularne dochodzenia epidemiologiczne

### Summary

**Introduction.** Tuberculosis is an infectious disease transmitted by droplet. In controlling the spread of the disease the most important is early detection of smear-positive patients, implementation of appropriate treatment and tracing the chain of transmission of infection. Many years of research on tuberculosis transmission in the environment of patients indicate, that the risk of infection among close contacts, especially family members, is very high. Therefore, epidemiological investigation should be extended to all persons who have contact with the TB patient and under special review should be the people living in the environment with patients with drug-resistant tuberculosis.

**Material and methods.** The subject of the study were drug-resistant *M. tuberculosis* complex strains isolated from 10 patients who were members of 4 families. In one of the families father and three grown children were identified, and in the remaining three families pairs of TB patients were identified – mother and 12-year-old son, mother and adult daughter and a marriage coming from Chechnya. In the Department of Microbiology IGiChP drug resistance patterns of strains were verified and investigated their genetic relatedness. The three-stage typing analysis, molecular methods have been used: spoligotyping, IS6110-Mtb1 Mtb2 PCR and MIRU-VNTR.

**Results.** Among the 10 strains tested, identified 4 strains resistant to SM, 2 INH-resistant, 2 resistant to INH + SM-resistant and 2 resistant to RMP + INH + SM + EMB + OFL (pre-XDR resistance) were identified. Analysis of DNA patterns indicated the genetic relatedness of strains isolated from patients within each family.

**Conclusions.** The observation of identical patterns of drug resistance and the same DNA profiles among strains isolated from family members confirmed the phenomenon of transmission of drug resistant tuberculosis among patients.

Key words: drug-resistant TB, transmission, molecular epidemiological investigations

<sup>1)</sup> Praca finansowana z grantu NCN-NN 404 572740.

## WSTĘP

W poprawnie prowadzonym nadzorze nad chorobami zakaźnymi śledzenie dynamiki narastania oporności mikroorganizmów i wdrażanie metod prewencji odgrywa bardzo ważną rolę. Metody te nabierają szczególnego znaczenia w przypadku gruźlicy, która rozprzestrzenia się drogą kropelkową, trudną do ograniczenia i jest przenoszona przez ludzi pomiędzy różnymi krajami i kontynentami. Powietrzna transmisja sprawia, że każda osoba chora na gruźlicę może stać się źródłem zakażenia dla zdrowych ludzi z otoczenia. Doniesienia na temat transmisji gruźlicy oraz rozpoznawania przypadków aktywnej postaci TB w otoczeniu chorych potwierdzają wysokie ryzyko zakażenia wśród osób pozostających w bliskim kontakcie oraz będących członkami rodzin wspólnie zamieszkujących (1-6). Ze względu na niebezpieczeństwo zakażenia wynikające z kontaktów z chorymi dochodzenie epidemiologiczne powinno objąć wszystkich pacjentów, u których podejrzewa się gruźlicę lub uzyskano potwierdzenie jej aktywnej postaci. Prześledzenie łańcucha transmisji ma na celu identyfikację wszystkich osób, które powinny zostać objęte leczeniem lub profilaktyką.

Problem gruźlicy lekoopornej dotyczy krajów, w których trudne warunki społeczno-ekonomiczne, niepoprawna diagnostyka chorych, niewłaściwy schemat leczenia oraz koincydencja z zakażeniem wirusem HIV ograniczają eliminację choroby ze społeczeństwa (7-10).

Metody typowania genetycznego są uzupełnieniem dla danych epidemiologicznych. Z uwagi na fakt, że nie zawsze udaje się ustalić, w jakich okolicznościach mogło dojść do kontaktu pomiędzy chorymi, jedynym dowodem na transmisję gruźlicy jest określenie pokrewieństwa genetycznego wyhodowanych szczepów.

W molekularnych badaniach epidemiologicznych kluczowe znaczenie ma dobór właściwej techniki typowania, która zapewnia jednoznaczne i właściwe wnioskowanie na temat pokrewieństwa szczepów (11-15).

## CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie pokrewieństwa genetycznego pomiędzy szczepami *M. tuberculosis* complex wyhodowanymi od osób blisko spokrewnionych oraz określenie fenotypu lekooporności szczepów wyhodowanych od członków tej samej rodziny.

## MATERIAŁ I METODY

**Materiałem do badań było 10 szczepów wyhodowanych od 10 członków 4 rodzin. W jednej z rodzin chorował ojciec i troje dorosłych dzieci, a w pozostałych trzech rodzinach zidentyfikowano dwóch chorych na gruźlicę – matkę i 12-letniego syna, matkę i dorosłą córkę oraz małżeństwo pochodzące z Czaczeni. Dwie rodziny (w tym małżeństwo narodowości czeczeńskiej) zamieszkiwały województwo mazowieckie, jedna rodzina zachodnio-pomorskie i jedna województwo łódzkie. Materiały kliniczne, z których wyhodowano szczepy, stanowiły: płwocina (8), popłuczyny oskrzelowe (1) i płyn z jamy otrzewnej (1). Szczepy wyhodowano na pożywce Löwensteina-Jensena (L-J)**

lub w systemach automatycznych: izotopowym Bactec 460-Tb oraz kolorymetrycznym MB/BacT, wg procedur stosowanych we wszystkich laboratoriach prątką w Polsce (42).

Oporność na 4 podstawowe leki przeciwprątkowe: izoniazyd (INH), ryfampicynę (RMP), streptomycynę (SM) i etambutol (EMB) oznaczano w regionalnych laboratoriach prątką, a uzyskane dane weryfikowano w KRLP (Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątką).

**Analizę molekularną 10 szczepów *M. tuberculosis* przeprowadzono z stosowaniem trzech metod: spoligotyping, IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR i MIRU-VNTR.** Szczepy, które posiadały jednakowe wzory molekularne klasyfikowano do odpowiednich klastrow. Szczepy prezentujące pojedyncze profile DNA stanowiły grupę szczepów o unikalnych wzorach genetycznych.

## Spoligotypowanie

Wzory hybrydyzacyjne uzyskane metodą spoligotyping przedstawiano w postaci zapisu binarnego i oktagonálnego przy użyciu arkusza kalkulacyjnego MS-Excel. Otrzymane wzory porównywano do wzorów zarejestrowanych w międzynarodowej bazie spoligotypów SpoIDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spoldb4.pdf>), a prezentujące je szczepy klasyfikowano do rodzin molekularnych (16).

## IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR

Etapem poprzedzającym reakcję PCR było trawienie DNA chromosomalnego restryktazą PvuII. Tak przygotowana matryca poddana została reakcji amplifikacji w dwóch kombinacjach starterów:

1. IS1+IS2+Mtb1;
2. IS1+IS2+Mtb2.

Warunki reakcji i skład mieszaniny reakcyjnej odpowiadały parametrom opisanym w pracy Kotłowskiego i wsp. (17).

Produkty PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym, w buforze TAE. Obecność i wielkość fragmentów DNA wykrywano po wybarwieniu bromkiem etydy, w świetle UV.

Analizę profili genetycznych uzyskanych metodą IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR prowadzono przy użyciu programu LabWorks 4.5. Wzory szczepów uznawano za identyczne tylko przy jednakowym układzie produktów PCR w obu reakcjach.

## MIRU-VNTR

DNA genomowy każdego szczepu poddawano 15 reakjom amplifikacji, w których wykorzystywano 15 par starterów. Warunki reakcji oraz skład mieszaniny reakcyjnej był zgodny z instrukcją opisaną przez Supply i wsp. (18). Produkty amplifikacji rozdzielano w 2% żelu agarozowym, w buforze TAE i wykrywano w świetle UV.

Wyniki typowania MIRU-VNTR przedstawiano w formie 15-cyfrowego zapisu. Każda z cyfr stanowiła liczbę powtórzeń sekwencji repetytywnej w kolejnym locus. Wielkość produktów PCR identyfikowano korzystając z programu LabWorks 4.5.

WYNIKI

**Analiza fenotypu lekooporności**

Wśród badanych 10 szczepów pochodzących od członków 4 rodzin, zidentyfikowano 4 szczepy odporne na SM w rodzinie, w której chorował ojciec i troje dorosłych dzieci, 2 szczepy odporne na INH u matki i syna, 2 szczepy odporne na INH+SM zidentyfikowane u czeczeńskiego małżeństwa i 2 szczepy odporne na INH+RMP+SM+EMB+OFL (typ oporności pre-XDR) wyizolowane od matki i córki (tab. 1). Wzory lekooporności badanych szczepów zidentyfikowano w oparciu o definicje opisane w literaturze (6).

**Analiza molekularna szczepów**

**Spoligotypowanie**

W badanej puli zidentyfikowano 8 szczepów mających swoje odpowiedniki w światowej bazie SpoIDB4 oraz 2 szczepy nie zarejestrowane na świecie.

W obrębie każdej z 4 badanych rodzin od członków wyhodowano szczepy o identycznym spoligotypie.

W rodzinie nr 1 zidentyfikowane szczepy wyhodowane od matki i syna należały do spoligotypu H3-T3 36, w rodzinie nr 2 u wszystkich członków stwierdzono szczepy o wzorze T1\_803, szczepy wyizolowane u chorych z rodziny

nr 3 posiadały nowe wzory, nie zarejestrowane w bazie SpoIDB4, a szczepy uzyskane od czeczeńskiego małżeństwa należały do rodziny molekularnej Beijing 1.

**IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR**

Na podstawie analizy wielkości produktów PCR, badane szczepy rozdzielono pomiędzy 4 profile molekularne IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR. W obrębie każdej z rodzin od członków wyhodowano szczepy o identycznym wzorze DNA w obu reakcjach PCR: IS1+IS2+Mtb1 i IS1+IS2+Mtb2 (ryc. 1).

**MIRU-VNTR**

W badanej puli szczepów zidentyfikowano 5 wzorów molekularnych MIRU-VNTR. Wzór 343635333434337 charakteryzował szczepy wyizolowane od matki i 12-letniego syna. Szczepy pochodzące od matki i córki z rodziny nr 3 posiadały kod 343444333443345, a szczepy Beijing 1 wyhodowane od obcokrajowców – kod 343753544441458.

W rodzinie nr 2 zidentyfikowano dwa szczepy (od ojca i córki) o wzorze 3435264221[2]3035 i dwa szczepy (od synów) o wzorze 3435264221[3]3035. Różnica w jednym *loci* nie wykluczyła bliskiego pokrewieństwa molekularnego szczepów (tab. 2).

Tabela 1. Wybrane dane o chorych i wyhodowanych od nich szczepach lekoopornych.

Rodzina	Nr szczepu	Członek rodziny	Wiek chorego	N/W*	Materiał kliniczny	AFB	Data wyhodowania szczepu	Lkooporność
1	1A	matka	36	N	plwocina	+	08. 2006	INH
	1B	syn	12	N	popłuczyny oskrzelowe	-		
2	2A	ojciec	58	W	plwocina	-	09. 2008	SM
	2B	córka	23	N	plwocina	-	03. 2008	
	2C	syn	29	N	plwocina	-	09. 2008	
	2D	syn	27	N	plwocina	+++	10. 2008	
3	3A	córka	24	W	plwocina	-	08. 2008	pre-XDR (INH+RMP+SM+EMB+OFL)
	3B	matka	52	W	plwocina	+		
4	4A	żona	28	N	śluz z otrzewnej	-	02. 2009	INH+SM
	4B	mąż	39	N	plwocina	-	02. 2010	

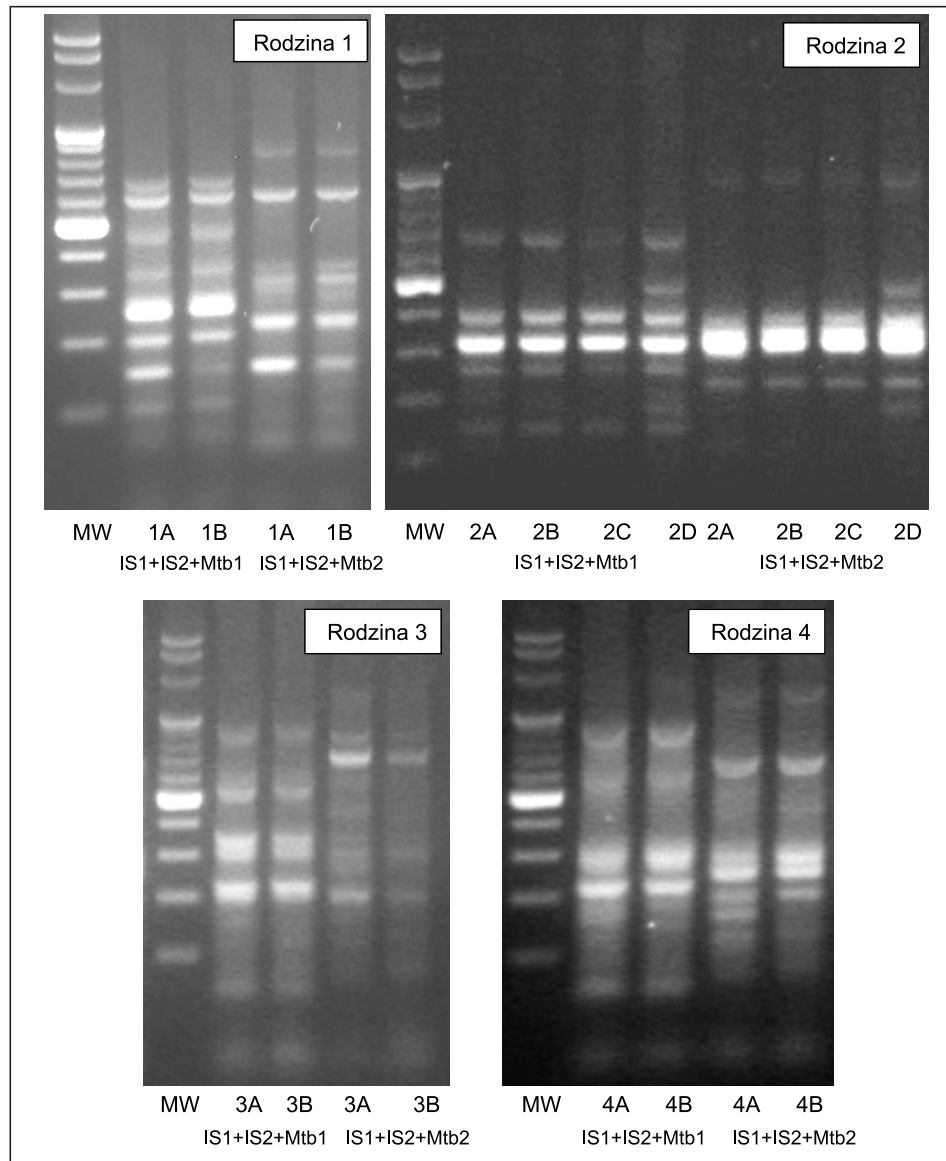
N/W\* – Chory nowo wykryty/wcześniej leczony.

Tabela 2. Wyniki analizy molekularnej z wykorzystaniem 3 metod typowania.

Rodzina	Nr szczepu	Spoligotyping	IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR	MIRU-VNTR
1	1A	H3-T3 36	Identyczne wielkości produktów PCR	343635333434337
	1B	H3-T3 36		343635333434337
2	2A	T1_803	Identyczne wielkości produktów PCR	3435264221[2]3035
	2B	T1_803		3435264221[2]3035
	2C	T1_803		3435264221[3]3035
	2D	T1_803		3435264221[3]3035
3	3A	NZ*	Identyczne wielkości produktów PCR	343444333443345
	3B	NZ*		343444333443345
4	4A	Beijing 1	Identyczne wielkości produktów PCR	343753544441458
	4B	Beijing 1		343753544441458

NZ\* – spoligotyp nie zarejestrowany w bazie SpoIDB4;

W ramkach [] zaznaczono różnice we wzorach MIRU-VNTR szczepów wyizolowanych od członków rodziny nr 2.



Ryc. 1. Wyniki typowania szczepów metodą IS6110-Mtb1-Mtb2 PCR. MW-marker wielkości; 1A, 1B – szczepy od członków rodziny nr 1; 2A, 2B, 2C, 2D – szczepy od członków rodziny nr 2; 3A, 3B – szczepy od członków rodziny nr 3, 4A, 4B – szczepy od członków rodziny nr 4; IS1+IS2+Mtb1, IS1+IS2+Mtb2 – kombinacje starterów wykorzystane w 2 reakcjach PCR.

## DYSKUSJA

Prawidłowo prowadzony nadzór nad gruźlicą, oprócz wczesnego wykrywania chorych prątkujących i ich leczenia, obejmuje również śledzenie dróg transmisji zakażenia. Od wielu lat wiadomo, że najlepszym sposobem zapobiegania rozprzestrzeniania się gruźlicy i nadzoru nad nią są przede wszystkim:

1. wykrycie chorego prątkującego i włączenie leczenia przeciwpłatkowego;
2. zbadanie wszystkich osób z otoczenia chorego, w celu wykrycia lub wykluczenia u nich gruźlicy.

**Badania nad transmisją gruźlicy w otoczeniu chorych wskazują, że ryzyko zakażenia dla osób pozostających w bliskim kontakcie jest bardzo wysokie, co jest związane przede wszystkim z mechanizmem przenoszenia się prątków gruźlicy drogą kropelkową.**

Z tego względu dochodzenie epidemiologiczne powinno objąć wszystkie osoby, które miały krótszy lub dłuższy kontakt z chorym.

Światowa Organizacja Zdrowia proponuje, aby dochodzenia epidemiologiczne przeprowadzać badając osoby, które udaje się pogrupować w „kręgi epidemiologiczne” wyznaczone wg czasu trwania oraz bliskości kontaktów z chorym.

Pierwszy krąg stanowią osoby:

- z kontaktów domowych, zamieszkujące wspólnie z chorym;
- przebywające z chorym przez dłuższy czas w zamkniętej przestrzeni: w czasie odbywania kary w więzieniu, zamieszkiwania wspólnie w domu opieki społecznej, itp.;
- z krótkich, ale intensywnych kontaktów np. podczas zabiegów w placówkach opieki medycznej.



Drugi krąg to grupa osób, które spotykały się z chorym na gruźlicę okolicznościowo, czyli krewni, znajomi, koledzy z pracy, ze szkoły.

Trzeci krąg stanowią osoby z kontaktów przypadkowych i/lub sporadycznych, takich jak spotkania w barach, w klubach sportowych, na wycieczkach (19, 20).

Pomimo że od lat wiadomo o narażeniu na zachorowanie u osób z otoczenia chorego, w wielu krajach wykrywanie chorych na gruźlicę wśród „kontaktów” nadal pozostaje na niskim poziomie, co powoduje niekontrolowane rozprzestrzenianie się choroby.

Aktywny sposób badania kontaktów polega na przeprowadzeniu badań u wszystkich osób, z którymi kontaktował się chory w życiu prywatnym i zawodowym.

Najczęściej jednak dochodzenia epidemiologiczne wśród osób pozostających w bliskim kontakcie z chorym mają charakter pasywny.

Wiadomo, że małe dzieci, które większość czasu spędzają w domu i pozostają pod stałą opieką rodziców lub opiekunów, są narażone na zachorowania, których źródłem są dorośli (21-25).

**U dzieci do 5. r.ż. do manifestacji objawów klinicznych gruźlicy dochodzi najczęściej w pierwszym roku od chwili zakażenia.** Można zatem sądzić, że występowanie gruźlicy w tej grupie chorych jest wskaźnikiem bieżącej transmisji, a wysoka liczba takich zdiagnozowanych przypadków może świadczyć o brakach w programach kontroli gruźlicy w danym kraju (26).

W pracy własnej badano 1 rodzinę, w których chorował 12-letni chłopiec i obficie prątkująca matka (AFB +++). Oboje byli chorymi nowo wykrytymi. Wyhodowane od nich szczepy były odporne na izoniazyd i posiadały identyczne profile molekularne. Na tej podstawie można sądzić, że syn prawdopodobnie zakaził się od matki lub, że źródło zakażenia dla obojga było wspólne.

Niewiele raportów medycznych dokumentuje transmisję gruźlicy od chorych dzieci. Brak takich danych wynika z przekonania, że dzieci nie prątkują i bardzo rzadko mogą być źródłem zakażenia *M. tuberculosis* dla innych osób (27).

Pozyskanie danych epidemiologicznych, nawet skąpych, dotyczących gruźlicy u dzieci jest utrudnione z kilku powodów, do których głównie należą: niedokładnie prowadzona rejestracja w wielu krajach świata, trudności w diagnozowaniu choroby z powodu niespecyficznych symptomów oraz mała czułość testów mikrobiologicznych, potwierdzających gruźlicę tylko w niewielkich odsetkach. Małe dzieci (< 5. r.ż.) bardzo rzadko wykrztuszają płwocinę, a jeżeli już taki materiał można od nich otrzymać, to w większości nie daje on pozytywnych wyników w metodzie bakterioskopowej (28-30).

**Popłuczyny żołądkowe, materiał rekomendowany przez WHO do mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy u dzieci, w badaniu mikroskopowym jest dodatni u około 20% chorych, a w około 50% przypadków uzyskuje się hodowlę prątków** (31). Nowoczesne

metody diagnostyczne są ograniczone do dużych, miejskich ośrodków i wymagają wysokich kwalifikacji personelu klinicznego i laboratoryjnego. Z tego powodu, wiele dzieci z gruźlicą nie jest nigdy zdiagnozowanych lub/i nie trafia w ogóle do rejestrów.

Zjawisko transmisji gruźlicy od dziecka choć rzadkie, to jednak jest możliwe (32-34). Dlatego nie można bagatelizować tego problemu i należy nadzorować małe dzieci z aktywną gruźlicą i ich kontakty w środowisku, a przede wszystkim szkoły, przedszkola i żłobki.

Gruźlica lekooporna, a szczególnie gruźlica MDR i XDR stanowi jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia populacji ludzkiej i prawidłowo prowadzonych programów walki z gruźlicą. Charakteryzuje się dużo gorszymi wynikami leczenia, często występującymi objawami ubocznymi, wysoką śmiertelnością i około 100 razy wyższymi kosztami terapii (35, 36).

Stwierdzono, że w każdym domu, gdzie znajduje się osoba z gruźlicą, 40-50% pozostałych członków rodziny może być zakażonych, a ok. 5% ma aktywną postać choroby (37, 38). Sytuacja staje się wyjątkowo niebezpieczna jeżeli w rodzinie wielodzietnej z małymi dziećmi znajduje się chory z gruźlicą wielolekooporną. Sugeruje się, aby w przypadkach gruźlicy MDR badania członków rodzin i osób z kontaktu prowadzić co najmniej przez 2 lata, a z gruźlicą XDR – 4 lata (4).

W piśmiennictwie nieliczne doniesienia omawiają gruźlicę lekooporną u dzieci. Dane o gruźlicy MDR w tej grupie chorych są ograniczone do kazuistyki lub opisu niewielu przypadków. W licznych badaniach stwierdzono, że dorośli z gruźlicą lekooporną są przyczyną infekcji i zachorowań u dzieci w kontaktach domowych z taką samą częstością jak chorzy z gruźlicą lekowrażliwą (39-41).

Transmisja gruźlicy lekoopornej wśród osób dorosłych jest problemem bardziej powszechnym i częściej opisywanym. Do głównych czynników sprzyjających rozprzestrzenianiu się gruźlicy wielolekoopornej w tej grupie jest zjawisko imigracji, głównie z krajów rozwijających się oraz transmisja w tak zwanych populacjach zamkniętych, do których należą więźniowie, bezdomni, pensjonariusze domów opieki społecznej, pacjenci szpitali oraz chorzy zakażeni wirusem HIV (6, 42-49).

W badaniach własnych dowiedziono, że w trzech rodzinach pomiędzy dorosłymi chorymi miała miejsce transmisja gruźlicy lekoopornej. Ponadto u badanych w pracy imigrantów zidentyfikowano niebezpieczne szczepy Beijing 1.

W dochodzeniach epidemiologicznych w gruźlicy najczęściej nasuwa się wniosek, że transmisja ma miejsce przede wszystkim w domu. Jednakże, nawet identyczne wzory molekularne szczepów mogą nie stanowić wystarczającego dowodu na to, że źródłem zakażenia jest osoba z najbliższej rodziny. Czasami źródło może być niezidentyfikowane i pochodzić spoza środowiska domowego. Jak wiele istnieje tych niezidentyfikowanych źródeł?

**Obecnie w dochodzeniach epidemiologicznych duże znaczenie mają molekularne metody identyfikacji wzorów DNA prątków gruźlicy.** Dzięki nim możliwe jest wskazanie kierunku transmisji pomiędzy chorymi nie powiązаныmi epidemiologicznie. **Szacuje się, że metody genetyczne mogą zwiększyć o 40% liczbę wykrywanych transmisji niemożliwych do identyfikacji jedynie drogą konwencjonalnych dochodzeń (50).**

## WNIOSKI

1. Molekularne dochodzenia epidemiologiczne pozwoliły potwierdzić transmisję gruźlicy lekoopornej pomiędzy członkami badanych rodzin i zidentyfikować szczególnie niebezpieczne szczepy z rodziny molekularnej Beijing 1.
2. Uzupełnienie dochodzeń epidemiologicznych o badania molekularne stanowi istotny postęp w śledzeniu dróg transmisji gruźlicy.

## PIŚMIENNICTWO

1. Zachariah R, Spielmann MP, Harries AD et al.: Passive versus active tuberculosis case finding and isoniazid preventive therapy among household contacts in a rural district of Malawi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 1033-1039.
2. Augustynowicz-Kopeć E, Koziańska M, Brzezińska S et al.: Wyniki molekularnych dochodzeń epidemiologicznych w gruźlicy wśród osób blisko spokrewnionych, chorujących na gruźlicę płuc. *Pneumo Info* 2007; 4: 14-22.
3. Koziańska M, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z et al.: Badanie transmisji *Mycobacterium tuberculosis* wśród osób blisko spokrewnionych chorych na gruźlicę. *Przegląd Epidemiologiczny* 2008; 62: 55-62.
4. Sia IG, Orillaza RB, St Sauver JL et al.: Tuberculosis attributed to household contacts in the Philippines. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 122-5.
5. Schaaf HS, Michaelis IA, Richardson M et al.: Adult-to-child transmission of tuberculosis: household or community contact? *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 426-31.
6. Koziańska M, Zwolska Z, Brzostek A et al.: Gruźlica lekooporna typu MDR, pre-XDR i XDR w Polsce, w latach 2000-2009. *Pneumonol Alergol Pol* 2011; 79, 4: 78-287.
7. Banerjee R, Allen J: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in California, 1993-2006. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 450-7.
8. Kwon Y, Kim Y, Suh G: Treatment outcomes for HIV-uninfected patients with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 496-502.
9. Mitrzyk B: Treatment of extensively drug-resistant tuberculosis and role of the pharmacist. *Pharmacotherapy* 2008; 28: 1243-1254.
10. Cox H, McDermid Ch: XDR tuberculosis can be cured with aggressive treatment. *Lancet* 2008; 372: 1363-1365.
11. Kwara A, Schiro R, Cowan L et al.: Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (6): 2683-2685.
12. Scott AN, Menzies D, Tannenbaum TN et al.: Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 89-94.
13. Niemann S, Rüscher-Gerdes S, Richter E et al.: Stability of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains in actual chains of transmission. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2563-7.
14. Augustynowicz-Kopeć E, Jagielski T, Koziańska M et al.: The significance of spoligotyping method in epidemiological investigations of tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol* 2007; 75: 22-31.
15. Alito A, Morcillo N, Scipioni S et al.: The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 788-91.
16. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al.: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
17. Kotłowski R, Shamputa IC, El Aila NA et al.: PCR-based genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with new GC-rich repeated sequences and IS6110 inverted repeats used as primers. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 372-7.
18. Supply P, Mazars E, Lesjean S et al.: Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36: 762-71.
19. Erkens CGM, Kamphorst M, Abubakar I: Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries; a European consensus. *Eur Respir J* 2010; 36: 925-949.
20. Lange C, Mori T: Advances In the diagnosis of tuberculosis. *Respirology* 2010; 15: 220-240.
21. Beyers N: Case finding in children in contact with adults in the house with TB. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 1013-1014.
22. Drucker E, Alcabes P, Bosworth W, Sckell B: Childhood tuberculosis in the Bronx, New York. *Lancet* 1994; 343: 1482-5.
23. Moss W: Tuberculosis in the home: contact history and childhood tuberculosis in central Harlem. *Clin Pediatr* 1998; 37: 753-5.
24. Schaaf HS, Michaelis IA, Richardson M et al.: Adult-to-child transmission of tuberculosis: household or community contact? *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 426-31.
25. Starke JR, Jacobs RF, Jereb J: Resurgence of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1992; 120: 839-55.
26. Hung Y, Jou R, Peng H, Chu Ch: Mother-infant transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype detected by spoligotyping – a case report. *Thorax* 2007; 22: 123-128.
27. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994; 43: 1-132.
28. de Charnace G, Delacourt C: Diagnostic techniques in paediatric tuberculosis. *Paediatric Resp Reviews* 2001; 2: 120-125.
29. Smith KC: Tuberculosis in children. *Curr Probl Pediatr* 2001; 31: 1-30.
30. Walls T, Shingadia D: Global epidemiology of paediatric tuberculosis. *J Infect* 2004; 48: 13-22.
31. Khan EA, Starke JR: Diagnosis of TB in children: increased need for better methods. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 115-123.
32. Aznar J, Safi H, Romero J et al.: Nosocomial transmission of tuberculosis infection in pediatrics wards. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 44-8.
33. Cardona M, Bek MD, Mills K et al.: Transmission of tuberculosis from a seven-year-old child in a Sydney school. *J Paediatr Child Health* 1999; 35: 375-8.
34. Matlow AG, Harrison A, Monteath A et al.: Nosocomial transmission of tuberculosis (TB) associated with care of an infant with peritoneal TB. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 222-3.
35. Goble M, Iseman MD, Madsen LA et al.: Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med* 1993; 328: 527-532.
36. Kent JH: The epidemiology of multidrug resistant tuberculosis in the United States. *Med Clin N Am* 1993; 77: 1391-1409.
37. Claessens NJ, Gausi FF, Meijnen S et al.: High frequency of tuberculosis in households of index TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 266-9.

38. Morrison J, Pai M, Hopewell PC: Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 359-68.
39. de Charnace G, Delacourt C: Diagnostic techniques in paediatric tuberculosis. *Paediatric Resp Reviews* 2001; 2: 120-125.
40. Pavlopoulou ID, Theodoridou M, Daikos GL et al.: Drug-resistant tuberculosis mastoiditis in 2 children. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 436-438.
41. Schluger NW, Lawrence RM, McGuinness G et al.: Multidrug resistant tuberculosis in children: two cases and a review of the literature. *Pediatr Pulm* 1996; 21: 138-142.
42. Augustynowicz-Kopec E: Gruźlica lekooporna w Polsce. Analiza epidemiologiczna, mikrobiologiczna i genetyczna. Rozprawa habilitacyjna. Warszawa: Wyd. Warsz. Uniw. Med. 2007; 1-230 pp.
43. Augustynowicz-Kopec E, Jagielski T, Kozińska M et al.: Molecular analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in central Poland. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 605-7.
44. Casal M, Vaquero M, Rinder H et al.: A case-control study for multidrug-resistant tuberculosis: risk factors in four European countries. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 62-7.
45. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in tuberculosis – United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57: 281-5.
46. Faustini A, Hall AJ, Perucci CA: Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 2006; 61: 158-63.
47. Gilad J, Borer A, Riesenberk K et al.: Epidemiology and ethnic distribution of multidrug-resistant tuberculosis in southern Israel, 1992-1997: the impact of immigration. *Chest* 2000; 117: 738-43.
48. Hersi A, Elwood K, Cowie R et al.: Multidrug-resistant tuberculosis in Alberta and British Columbia, 1989 to 1998. *Can Respir J* 1999; 6: 155-60.
49. Lomtadze N, Aspindzelashvili R, Janjgava M et al.: Prevalence and risk factors for multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 68-73.
50. McNabb SJ, Kammerer JS, Hickey AC et al.: Added epidemiologic value to tuberculosis prevention and control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 589-97.

otrzymano/received: 18.08.2011

zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:

\*Monika Kozińska

Zakład Mikrobiologii IGIChP

ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa

tel./fax: (22) 431-21-82

e-mail: m.kozinska@igichp.edu.pl