

Molekulárně genetická studie mykobakteriálních kmenů prevalujících na území České republiky v roce 2014

Pinková M., Tietzeová E., Zemanová I., Dvořáková V.

Státní zdravotní ústav Praha – Národní referenční laboratoř pro mykobakterie

SOUHRN

Cíl práce: Identifikovat kmeny *Mycobacterium tuberculosis* prevalující na území České republiky v roce 2014.

Materiál a metodika: DNA 269 kmenů *M. tuberculosis* získaných od pacientů žijících na území ČR v roce 2014. Kmeny byly postupnou analýzou zařazeny do geneticky příbuzných skupin webovým softwarem MIRU-VNTRplus.

Výsledky: Byly identifikovány čtyři globální linie: 1 Indo-Oceánská, 2 Východo-Asijská (13,8 %), 3 Středo-Asijská a 4 Euro-Americká (83,6 %) se subliniemi: Haarlem (44,2 %), H37Rv, Cameroon, Latinská Amerika-Středomoří (LAM), Haarlem / X, NEW-1, URAL, S, X, TUR a Ugandal. Plná identita repetitivních sekvencí byla prokázána u 27,1 % kmenů dvou globálních linií: 2 Východo-Asijská (2 skupiny) a 4 Euro-Americká (21 skupin): sublinie Haarlem

(11 skupin), H37Rv (3 skupiny), Cameroon (2 skupiny), Haarlem / X (2 skupiny), X (1 skupina), LAM (1 skupina) a S (1 skupina). V souboru získaných kmenů bylo sedm multirezistentních (MDR) kmenů bez klastrování. Čtyři MDR kmeny globální linie 2 Východo-Asijské (Beijing) a tři MDR kmeny globální linie 4 Euro-Americké (2 kmeny sublinie Latinská Amerika-Středomoří (LAM) a 1 kmen sublinie Haarlem).

Závěry: Jednoletá studie zaměřená na identifikaci mykobakteriálních kmenů prevalujících na celém území České republiky v roce 2014. Studie přináší první geografický obraz o plošném rozložení kmenů *M. tuberculosis* v populaci.

KLÍČOVÁ SLOVA

linie *Mycobacterium tuberculosis* – repetitivní sekvence – identifikace

ABSTRACT

Pinková M., Tietzeová E., Zemanová I., Dvořáková V.: Molecular study of mycobacterial strains prevalent in the Czech Republic in 2014

Aim: To identify *Mycobacterium tuberculosis* strains prevalent in the Czech Republic in 2014.

Material and methods: DNA from 269 *M. tuberculosis* strains obtained from patients residing in the Czech Republic in 2014. Based on a step-by-step analysis, the strains were classified into genetically related groups using the MIRU-VNTRplus website.

Results: Four global lineages were identified: 1 Indo-Oceanic, 2 East-Asian (13.8%), 3 Central-Asian, and 4 Euro-American (83.6%) with the following sublineages: Haarlem (44.2%), H37Rv, Cameroon, Latin American-Mediterranean (LAM), Haarlem / X, NEW-1, URAL, S, X, TUR, and Ugandal. Fully identical repetitive sequences were found in 27.1% of strains belonging to two

global lineages: 2 East-Asian (2 groups) and 4 Euro-American (21 groups): sublineages Haarlem (11 groups), H37Rv (3 groups), Cameroon (2 groups), Haarlem / X (2 groups), X (1 group), LAM (1 group), and S (1 group). In the set of study strains, seven were multidrug resistant without clustering. Four MDR strains belonging to global lineage 2 East-Asian (Beijing) and three MDR strains belonging to global lineage 4 Euro-American (2 strains of sublineage Latin American-Mediterranean (LAM), and 1 strain of sublineage Haarlem).

Conclusions: A one-year study aimed at the identification of mycobacterial strains prevalent all over the Czech Republic in 2014. The study is the first to present data on the geographical distribution of *M. tuberculosis* strains in the population.

KEYWORDS

lineage of *Mycobacterium tuberculosis* – repetitive sequences – identification

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 68, 2019, č. 3, s. 131–136

ÚVOD

Tuberkulóza (TBC) je zánětlivé onemocnění patřící v České republice k povinně hlášeným nemocem. Onemocnění způsobují acidorezistentní tyčky pomalu rostoucí bakterie *Mycobacterium tuberculosis* komplex, tzv. Kochův bacil. Nejčastěji je způsobené druhem *M. tuberculosis*. Celosvětově patří TBC stále k nejsledovanějším nemocem, patří mu druhá příčka mezi úmrtími na infekční nemoci. Ve světě je sociální chorobou značně rozšířenou v rozvojových zemích. Vysoký výskyt tohoto onemocnění je především v Číně, Indii a Ruské federaci. Tyto země se potýkají také s vyšším výskytem rezistence na antibiotika používaná k léčbě TBC. Většina hlášených multirezistentních (MDR) kmenů *M. tuberculosis* pochází

tedy z východní Evropy a centrální Asie. Česká republika patří podle WHO mezi oblasti s nejnižším výskytem tohoto onemocnění na světě, a to i v porovnání s evropskými zeměmi [1]. V roce 2014 byla incidence onemocnění TBC v České republice 4,8/100 000 obyvatel. Vyšší incidence než republikový průměr mělo hlavní město Praha (7,8/100 000 obyvatel), kraj Středočeský (5,8/100 000 obyvatel), Pardubický (5,4/100 000 obyvatel), Olomoucký (5,2/100 000 obyvatel) a Královehradecký (5,1/100 000 obyvatel). Nejnižší incidence počtu hlášených onemocnění byla v Jihočeském kraji (2,4/100 000 obyvatel). Podíl pacientů s onemocněním TBC, který tvoří cizí státní příslušníci, byl v roce 2014 18,7 % a podle zdravotnických statistik stále mírně narůstá [2].

PŮVODNÍ PRÁCE

Sledování neustále probíhajícího evolučního vývoje *M. tuberculosis* umožňují polymorfismy v DNA. Genotypizace *M. tuberculosis* je pro mikrobiologii a epidemiologii nepostradatelná. Důležitost genotypizace tuberkulózy potvrdily za posledních 20 let stovky významných publikací [3, 4]. Pro identifikaci a analýzu polymorfismu některých typů opakujících se jednotek v DNA jsou využívány tyto molekulární metody: RFLP (Restriction fragment length polymorphism), spoligotypování a MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeats) či celogenové sekvenování [4].

V předkládané studii bylo provedeno molekulárně genetické testování pomocí metody MIRU-VNTR druhu *M. tuberculosis* s cílem rozčlenit tento druh do linií, sublinií a vytvoření geneticky příbuzných skupin pro potřeby současných i budoucích epidemiologických studií, zejména za účelem zjišťování patogenity.

MATERIÁL A METODIKA

Pro izolaci DNA a identifikaci genotypů byly použity následující kity a reagenty – izolační kit GenoLyse (HAIN), 24 párů primerů [5] (GeneriBiotech), HotStarTaq DNA Polymerasekit (QIAGEN), polymeráza KAPA2G Robust (Elisabeth Pharmacon), PCR dNTP mix (Top-Bio), agaróza (SIGMA), interkalační barvivo SERVA DNA Stain G (SERVA), 50 bp DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs), 100 bp DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs).

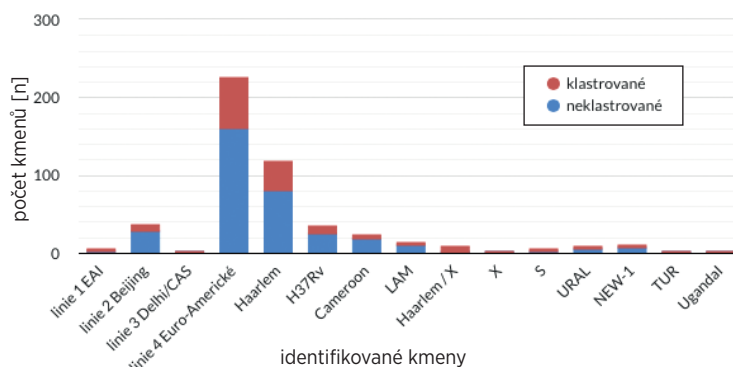
K identifikaci byl použit referenční kmen *M. tuberculosis* H37Rv a 269 kmenů *M. tuberculosis* získaných od pacientů s TBC žijících v roce 2014 na území čtrnácti statutárních celků České republiky (Hlavního města Praha a třinácti krajů: Středočeského, Jihočeského, Plzeňského, Karlovarského, Ústeckého, Libereckého, Královhradeckého, Pardubického, Olomouckého, Moravskoslezského, Jihomoravského, Zlínského a Kraje Vysočina). Mezi analyzovanými kmeny bylo sedm MDR kmenů; čtyři kmeny z hl. m. Prahy a po jednom kmenu ze Středočeského, Libereckého a Moravskoslezského kraje. V souboru 269 kmenů bylo 57 kmenů od pacientů s cizí státní příslušností.

Ze získaných kmenů byla v naší laboratoři provedena izolace DNA pomocí izolačního kitu GenoLyse (HAIN) a zhotoveno 269 izolátů DNA. Z každého izolátu *M. tuberculosis* a referenčního kmene H37Rv byly polymerázovou řetězovou reakcí (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) připraveny amplicony (PCR produkty vzniklé metodou rychlého selektivního zmmnožení – amplifikací určité oblasti DNA v podmínkách *in vitro*). Amplifikované úseky DNA byly ohraničeny čtyřadvaceti páry tzv. primerů (oligonukleotidů), což jsou krátké fragmenty DNA [6] (GeneriBiotech). Syntéza vybraného úseku DNA probíhala od přisedlých primerů termostabilními polymerázami HotStarTaq DNA Polymerasekit (QIAGEN) nebo KAPA2G Robust (Elisabeth Pharmacon). Pro genetickou analýzu lokusů byly PCR produkty nanášeny na 2% agarózový gel (agaróza SIGMA) a vizualizovány interkalačním barvivem SERVA DNA Stain G. Fotodokumentace gelů byla pořizována fotoaparátem Canon PowerShot_SX510_HS. Na fotodokumentaci

byl vizuálně odečten počet repetitivních sekvencí podle vyhodnocovací tabulky [6, 7]. K porovnání velikostí fragmentů DNA generovaných v PCR byl použit 50 bp DNA Ladder a 100 bp DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs). Mykobakteriální kmeny získané od pacientů v roce 2014 byly označeny pětímístným či šestímístným kódem. První dvě čísla značí rok, kdy byl materiál odebrán. Číslo izolátu představují tři či čtyři následující čísla. Pod těmito kódy byly kmeny řazeny do fylogeneticky příbuzných skupin. Shluková analýza a identifikace linií a sublinií byla provedena online přístupným webovým softwarem MIRU-VNTRplus [6, 7]. Tento volně přístupný software umožňuje uživatelům analyzovat údaje získané vyšetřením jejich kmenů. Referenční databáze kmenů reprezentuje 186 kmenů MTBC (*Mycobacterium tuberculosis* komplex). Panel MIRU-VNTR se skládá z následujících 24 lokusů: 154 - 424 - 577 - 580 - 802 - 960 - 1644 - 1955 - 2059 - 2163b - 2165 - 2347 - 2401 - 2461 - 2531 - 2687 - 2996 - 3007 - 3171 - 3192 - 3690 - 4052 - 4156 - 4348. Profily kmenů představují sérii 24 čísel odpovídajících počtu opakování v repetitivních sekvencích v každém lokusu. Například počet repetitivních sekvencí referenčního kmene H37Rv je: 2-2-4-3'-1-3-2-2-5-3-4-2-3-6-1-3-3-3-3-5-5-2-2- [6, 7]. Klastrované izoláty jsou definovány jako dva nebo více izolátů se shodným počtem repetitivních sekvencí u 24 lokusů ve výše uvedeném pořadí.

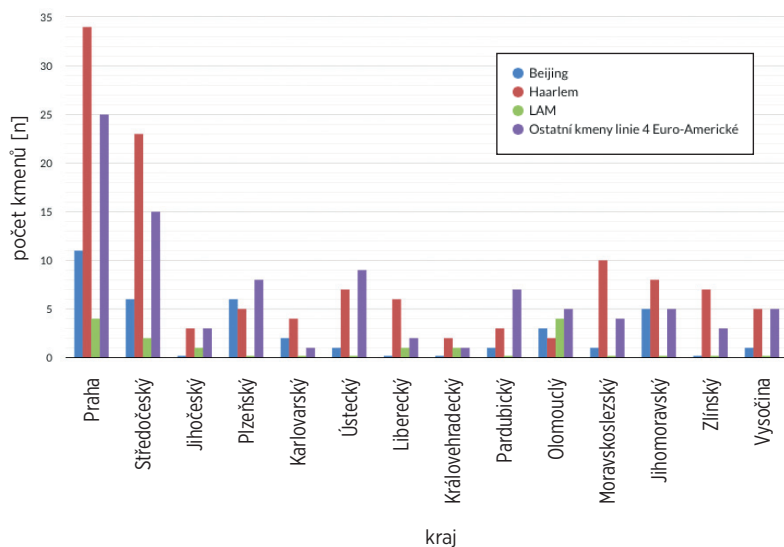
VÝSLEDKY

Kmeny *M. tuberculosis* získané od 269 pacientů (z toho 57 cizinců a 7 MDR) žijících v roce 2014 ve čtrnácti územních celcích České republiky (ČR) byly rozděleny do linií a sublinií a zařazeny do geneticky příbuzných skupin. Z globálních linií byla v našem souboru identifikována linie **1 Indo-Oceánská**: EAI n = 4, **2 Východo-Asijská**: Beijing n = 37, **3 Středo-Asijská**: Delhi/CAS n = 3 a **4 Euro-Americká**: n = 225 sublinií: Haarlem n = 119, H37Rv n = 36, Cameroon n = 24, Latinská Amerika-Středomoří (LAM) n = 13, Haarlem/X n = 9, NEW-1 n = 8, URAL n = 6, S n = 5, X n = 3, TUR = 1 a Uganda I n = 1. Grafické znázornění kvantitativního zastoupení prevalujících linií/sublinií v ČR představuje graf 1. Rozložení kmenů genotypu Beijing, Haarlem, Latinská Amerika-Středomoří (LAM) a ostatních genotypů **Euro-americké linie 4** v jednotlivých krajích ČR znázorňuje graf 2.



Graf 1. Kvantitativní zastoupení linií a sublinií linie 4 *M. tuberculosis* prevalujících v ČR v roce 2014.

Graph 1. Quantitative distribution of *M. tuberculosis* lineages and lineage 4 sublineages in the Czech Republic in 2014



Graf 2. Rozložení kmenů genotypu Beijing, Haarlem, LAM a ostatních genotypů 4 Euro-Americké linie na území ČR v roce 2014.
Graph 2. Distribution of strains of genotypes Beijing, Haarlem, LAM, and other Euro-American lineage 4 genotypes in the Czech Republic in 2014

Plná identita repetitivních sekvencí 24 lokusů byla zjištěna u dvou globálních linií: **2 Východo-Asijské a 4 Euro-Americké** (linie 1 a 3 neklastrovaly). Tabulka 1 uvádí počet klastrů, jejich velikost a poměrné zastoupení v populaci. Grafické vyjádření výsledků shlukové/klastrové analýzy ilustruje dendrogram na obrázku 1.

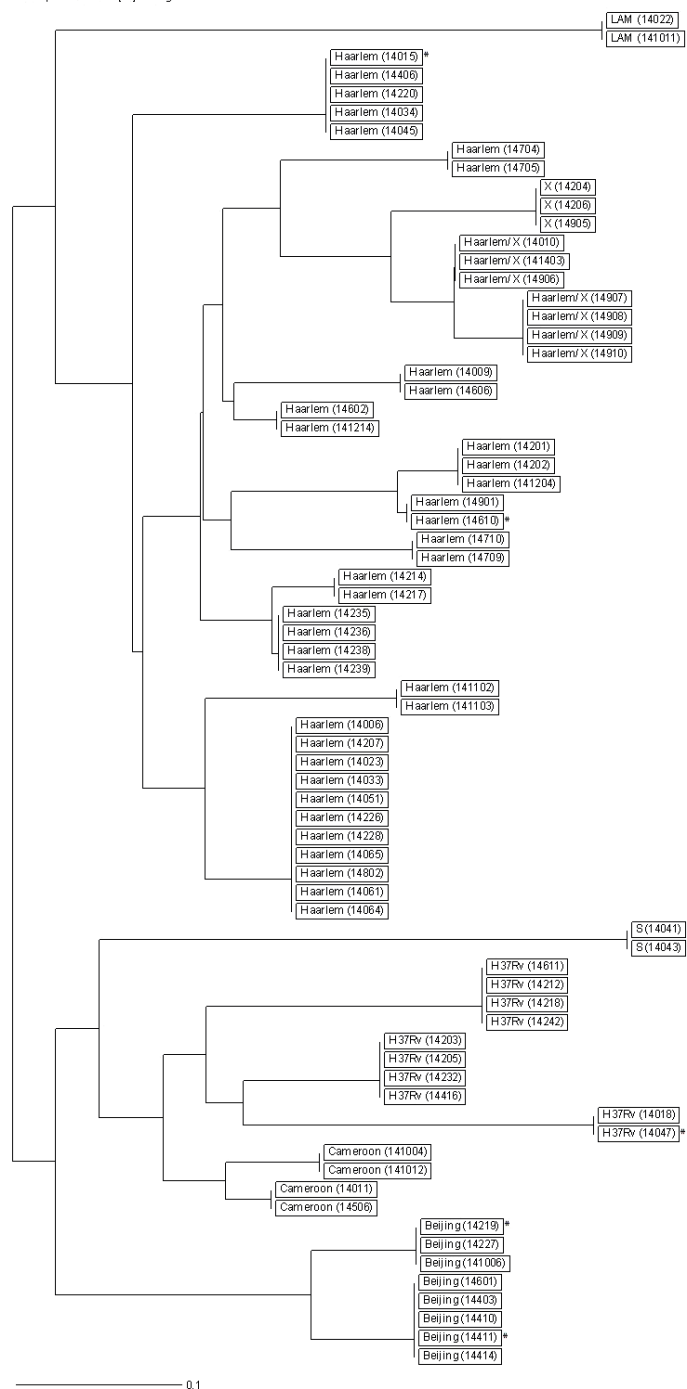
Ze souboru 269 kmenů bylo 6 kmenů od pacientů s cizí státní příslušností součástí šesti klastrových skupin (označení hvězdičkou *, viz obr. 1). Čtyři kmeny byly zařazeny do globální linie **4 Euro-Americké** (sublinie Haarlem, S a H37Rv) a dva kmeny do linie **2 Východo-Asijská** (sublinie Beijing; 51 kmenů neklastrovalo). Sublinie Haarlem (linie **4 Euro-Americké**) vytváří nejvyšší podíl klastrovaných kmenů v ČR; celkem 11 klastrových skupin. U dvou skupin se dvěma klastrovanými kmeny sublinie Haarlem byl prokázán příbuzenský vztah. U skupiny čtyř klastrovaných kmenů sublinie Haarlem/X byla zjištěna blízkost bydliště (viz tab. 1, obr. 1).

Tabulka 1. Diferenciace kmenů druhu *M. tuberculosis* v roce 2014
Table 1. Identification of *M. tuberculosis* strains in 2014

Globální linie	Sublinie	Počet kmenů celkem	Počet klastrovaných kmenů	Počet klastrů celkem	Zastoupení jednotlivých klastrů	Počet klastrovaných kmenů/počet kmenů celkem
1 Indo-Oceánská	EAI	4	0	0	0	0/269
2 Východo-Asijská	Beijing	37	8	2	1	1/54
					1	1/90
3 Středo-Asijská	Delhi/CAS	3	0	0	0	0/269
4 Euro-Americká	Haarlem	119	37	11	1	2/49
					1	1/54
					1	1/67
					1	1/90
					7	
					1	1/67
					1	1/90
H37Rv	36	10	3	2	1/67	
				1		
				2		
Cameroon	24	4	2	2		
				1		
X	3	3	1	1	1/90	
LAM	13	2	1	1		
S	5	2	1	1		
		209	65	21		
Kmeny globální linie 2 a 4 celkem		246	73	23		

PŮVODNÍ PRÁCE

NJ-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical



Obr. 1. Dendrogram klastrovaných kmenů linie 2 Východo-Asijské a 4 Euro-Americké na území ČR v roce 2014

Vysvětlivky:

*kmen získaný od pacienta s TBC s cizí státní příslušností

ªkmeny získané od matky a dcery

¸kmeny získané od dvou bratrů

Figure 1. Dendrogram of clustered East-Asian lineage 2 and Euro-American lineage 4 strains the Czech Republic in 2014

Note:

*strain obtained from a non-resident TB patient

ªstrains obtained from a mother and her daughter

¸strains obtained from two brothers

Majoritní linie **4 Euro-Americká** prevalovala na celém území ČR (viz graf 2), způsobila onemocnění TBC 83,6 % pacientům (ve 13 % u cizích státních příslušníků). Další významnou sublinií, která byla identifikována u 13,8 % pacientů (z toho 5,6 % cizinců) je linie **2 Východo-Asijská** sublinie Beijing. Tato sublinie byla identifikována ve všech krajích kromě kraje Jihočeského, Libereckého, Královéhradeckého a Zlínského (viz graf 2).

Kmeny globální linie **1 Indo-Oceánská**, **3 Středo-Asijská** sublinie Delhi/CAS, **4 Euro-Americká** sublinie NEW-1, URAL, X, TUR a Uganda I byly bez klastrování.

Kmeny MDR (7 kmenů; 2,6 %) nebyly klastrovány. Byla u nich identifikována linie **2 Východo-Asijská** sublinie Beijing (4 kmeny) a linie **4 Euro-Americká** sublinie LAM (2 kmeny) a sublinie Haarlem (1 kmen). Ze skupiny MDR kmenů patřily 4 kmeny pacientům s cizí státní příslušností.

DISKUSE

V předkládané studii bylo provedeno genotypování pomocí metody MIRU-VNTR repetitivní sekvence kmenů *M. tuberculosis* u 269 pacientů. Jedná se o molekulárně genetickou metodu navazující na RFLP a spoligotyping. V posledních deseti letech se v rámci TBC tyto metody staly základem pro diferenci genotypů a jejich distribuci v národní i nadnárodní úrovni [4]. Vzhledem k tomu, že je TBC v nadnárodním měřítku vedoucí příčinou úmrtí na infekční onemocnění, v roce 2017 [8] na toto onemocnění celosvětově zemřelo odhadem 1,7 milionů nakažených, je tomuto onemocnění věnována široká vědecká pozornost. Jak již bylo zmíněno výše, ačkoli je incidence onemocnění TBC v ČR pouze 4,8/100 000 obyvatel, představuje toto onemocnění závažnou nákazu, které je třeba věnovat pozornost a intenzivně pracovat na epidemiologických studiích. Vzhledem k tomu, že globální zátěž TBC spadá především na rozvojové země, jsou pro návrh vhodných strategií pro kontrolu nemoci nezbytné přesné odhady přistěhovalectví. Tento trend potvrzuje např. studie [9], z níž je patrné, že z 1 080 pacientů, kteří byli do studie zahrnuti, bylo 614 pacientů (56,9 %) italské národnosti a 466 pacientů (43,1 %) byli cizinci (z toho 27,9 % pocházelo z Afriky, 23,6 % z Asie, 22,3 % z východní Evropy a 11,6 % ze Střední a Jižní Ameriky). V naší předkládané práci bylo zjištěno, že v České republice (ČR) z 269 pacientů, pocházelo pouze 57 kmenů od pacientů s cizí státní příslušností, tedy o polovinu méně, než u výše zmíněné studie v Itálii. V ČR však není tak vysoký výskyt cizinců z Afriky a Jižní Ameriky. Dále bylo zjištěno, že ze skupiny 7 multirezistentních kmenů patřily 4 kmeny pacientům s cizí státní příslušností. Fakt, že v ČR není v současné době tak vysoký podíl cizinců z celkového počtu pacientů, nijak neubírá na důležitosti předkládané studie

a lze spíše předpokládat, že v souvislosti s globalizací bude trend incidence TBC v ČR minimálně u cizinců vzrůstající.

V současnosti je *M. tuberculosis* komplex způsobující onemocnění TBC u člověka řazen do sedmi fylogenetických globálních linií: **linie 1** Indo-Oceánská (EAI), **linie 2** Východo-Asijská (Beijing), **linie 3** Středo-Asijská (CAS), **linie 4** Euro-Americká, Africká linie 1, Africká linie 2 a Etiopská linie 7. V předkládané studii byl testován druh *M. tuberculosis*, u kterého řada autorů popisuje 5 globálních linií: EAI, Beijing, CAS, Euro-Americká linie a poslední identifikovaná linie byla linie Etiopská [6]. V naší studii byly identifikovány 4 linie z 5 a to i u pacientů s cizí státní příslušností (tabulka 1, graf 1; linie 7 nebyla identifikována). Tyto výsledky korespondují s již dříve publikovanými daty získanými v rámci evropských studií, z nich je rovněž patrné, že největší zastoupení má **linie 4** Euro-Americká, následuje **linie 2** Východo-Asijská (Beijing) a malé nebo žádné zastoupení má **linie 1** EAI, **linie 3** CAS a **linie 7** Etiopská [9]–[11]. Bylo jednoznačně zjištěno, že nejrozšířenějším původcem TBC v populaci je kmen globální **linie 4** (Euro-Americká). Prevalujícími subliniemi byly Haarlem a LAM. Tyto výsledky jsou opět v souladu s již dříve publikovanými daty u jiných autorů [12, 13], v naší studii byl největší počet kmenů zařazen do sublinie Haarlem (obrázek 1, graf 1, tabulka 1). Ke stejnému závěru dospěla i naše studie z roku 2013–2014 v Praze [14]. Důvody globálního úspěchu **linie 4** a jejích sublinií nejsou zcela známé. Nicméně vzhledem k faktu, že je tato linie geneticky a fenotypově různorodá (fylogeograficky divergentní) s vysokou prevalencí, je díky této vlastnosti dobrou charakteristikou pro určování epidemiologie různých subtypů v různých částech světa. Podrobnou studii globální distribuce a geografické členění **linie 4** a jejích sublinií uvádí publikace [15] u 3 366 kmenů *M. tuberculosis* komplex. Autoři uvádějí, že globální úspěch **linie 4** je odrazem migrace v populaci člověka. V naší předkládané studii byly identifikovány dva příbuzenské/epidemiologické vztahy mezi pacienty s TBC způsobenou právě **linií 4** a její sublinií Haarlem (obrázek 1). Identifikované MDR kmeny **linie 4** byly zařazeny do sublinií LAM (2 ze 7 kmenů) a Haarlem (1 ze 7 kmenů), ostatní 3 pacienti byli **linie 2** Východo-Asijské-Beijing. Tato data jsou opět v souladu s již dříve publikovanými pracemi. Řada autorů v nich uvádí, že sublinie LAM a sublinie Beijing je spojována s rezistencí na antibiotika [16, 17], proto je těmto kmenům potřeba věnovat zvláštní pozornost. Navíc Merker et al. (2015) uvádějí, že sublinie Beijing vznikla na Dálném východě, odkud se do celého světa rozšířila v několika vlnách, přičemž dochází k postupnému zvětšování velikosti populace této sublinie. Tato zjištění plně korespondují s našimi daty, kdy v ČR v letech 2013–2014 bylo v hlavním městě Praze identifikováno 10 neklastrovaných kmenů linie Beijing [14]. V předkládané studii z let 2014–2015 bylo identifikováno 37 kmenů Linie Beijing z toho 11 kmenů bylo identifikováno v hlavním městě Praze (viz graf 2, tab. 1).

I přes zásadní změny v léčbě TBC spolu s rozvojem země a s tím spojenou globalizací, se nedaří snižovat výskyt této nemoci. Naopak přibývá rezistentních kmenů mykobakterií. Tato studie obsahuje zásadní informace o shromažďování dat týkajících se rozšířenosti druhu *M. tuberculosis* za účelem určení linií (sublinií), pro potřeby

identifikace faktorů rezistence a incidence TBC v národní i nadnárodní úrovni.

ZÁVĚR

Předkládáme výsledky studie identifikace a rozložení kmenů prevaluujících na území České republiky v roce 2014 pomocí molekulární metody MIRU-VNTR druhu *M. tuberculosis*. Díky numerickému kódu a programu MIRU-VNTRplus lze kmeny a tedy i výsledky této studie velmi snadno porovnávat a použít pro srovnání v rámci různých studií dalších laboratoří. Toto uplatnění má význam především při identifikaci mikroepidemií a přeshraničního přenosu.

Při víceletém genotypování lze vysledovat původní zdroj infekce a její přenos. Pro prokázání mikroepidemií a nálezů mezi příbuznými je také důležitá spolupráce s epidemiology a klinickými lékaři. Předkládané výsledky mohou být podkladem pro další molekulárně epidemiologické studie doplněné dalšími metodami molekulární typizace.

LITERATURA

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2016, 17-bře-2016. [Online]. Dostupné na [www: http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2016](http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2016). [Viděno: 15-dub-2019].
2. ÚZIS ČR. Tuberkulóza a respirační nemoci 2013. [Online]. Dostupné na [www: https://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2013](https://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2013). [Viděno: 15-dub-2019].
3. Felipe Garcia D., Astudillo M. MIRU-VNTR genotyping of *M. tuberculosis* in a population of patients from Santiago De Cali, Colombia, 2013–2015, *Biomedica*, 2019;39.
4. Amlerova J, Bitar I, Hrabak J. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using whole genome sequencing. *Folia Microbiol*, 2018;63(5):537–545.
5. Supply P, et al. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(12):4498–4510.
6. Allix-Béguec C, et al. 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. *J Clin Microbiol*, 2008;46(8): 2692–2699.
7. Weniger T, et al. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res*, 2010;38, web server issue:W326–331.
8. WHO. Global tuberculosis report 2018 [online]. Dostupné na [www: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). [Viděno: 16-dub-2019].
9. Garzelli C, et al. Impact of immigration on tuberculosis in a low-incidence area of Italy: a molecular epidemiological approach. *Clin Microbiol Infect*, 2010; 16(11):1691–1697.
10. Gagneux S, Small MP. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*, 2007;7(5):328–337.
11. Nebenzahl-Guimaraes H, et al. Genomic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 7 and a proposed name: 'Aethiops vetus'. *Microb Genomics*, 2016;2(6).

PŮVODNÍ PRÁCE

12. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol*, 2014;26(6):431-444.
13. Demay C, et al. SITVITWEB – a publicly available international multimer database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*, 2012;12(4):755-766.
14. Tietzeová E, Pinková M, Zemanová I. Molekulární epidemiologie tuberkulózy v hlavním městě Praha v letech 2013 a 2014. [Online]. Dostupné na [www: https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2018-2-5/molekularni-epidemiologie-tuberkulozy-v-hlavnim-meste-praha-v-letech-2013-a-2014-104981](https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2018-2-5/molekularni-epidemiologie-tuberkulozy-v-hlavnim-meste-praha-v-letech-2013-a-2014-104981). [Viděno: 18-dub-2019].
15. Stucki D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet*, 2016; 48(12):1535-1543.
16. Merker M. et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet*, 2015;47(3):242-249.
17. Valcheva V, et al. Utility of New 24-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Typing for Discriminating *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Collected in Bulgaria. *J Clin Microbiol*, 2008;46(9):3005-3011.

Podpořeno MZ ČR – RVO („Státní zdravotní ústav – SZÚ, 75010330“).

Do redakce došlo dne 1. 3. 2019.

Adresa pro korespondenci:

RNDr. Martina Pinková

Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48
100 00 Praha 10

Ing. Věra Dvořáková, Ph.D.

e-mail: vera.dvorakova@szu.cz