

Anna Brzostek¹, Jarosław Dziadek^{1, 2}

¹Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

²Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy w Rzeszowie

Kierownik: prof. dr hab. J. Dziadek

Molekularne metody genotypowania prątków gruźlicy w dochodzeniach epidemiologicznych transmisji zakażeń

Molecular genotyping methods in epidemiological investigations of TB infections

Pneumonol. Alergol. Pol. 2012; 80, 3: 193–197

Gruźlica pozostaje jednym z najistotniejszych problemów zdrowotnych na świecie. Szacuje się, że 1/3 populacji ludzkiej zakażona jest prątkiem gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*). Każdego roku odnotowuje się 8–9 milionów nowych zachorowań i 2 miliony zgonów z powodu gruźlicy. Gruźlica należy zatem do wiodących przyczyn umieralności z powodu wszystkich chorób zakaźnych. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) przewiduje, że do 2015 roku niemal miliard ludzi zarazi się prątkiem gruźlicy, około 200 milionów zachoruje, a 35 milionów umrze z powodu gruźlicy [1, 2]. Wśród czynników negatywnie wpływających na sytuację epidemiologiczną gruźlicy wymienić należy: niski poziom wykrywalności przypadków choroby, duża liczba lekoopornych szczepów *M. tuberculosis*, występowanie współzakażenia *M. tuberculosis* i HIV, napływ imigrantów z krajów o wysokim wskaźniku zapadalności gruźlicy, złe warunki socjoekonomiczne, a także brak sprawnych programów zwalczania gruźlicy. Choroba ta występuje przede wszystkim w krajach rozwijających się, gdzie notuje się 95% wszystkich nowych zachorowań i 98% wszystkich zgonów. Gruźlica jest obecna także w społecznościach krajów wysoko rozwiniętych.

W epidemiologii gruźlicy, podobnie jak w przypadku innych chorób zakaźnych, zdefiniowa-

nie źródła zakażenia oraz prześledzenie jego transmisji w środowisku stanowią ważne cele badawcze. Stąd też, metody różnicowania mikroorganizmów umożliwiające identyfikację czynnika zakaźnego na poziomie gatunku, jak również szczepu są szczególnie poszukiwane [3, 4]. Różnicowanie prątków na poziomie szczepów stało się możliwe dopiero w połowie lat 80. XX wieku, kiedy to nastąpił dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej [5]. Typowanie genetyczne (genotypowanie), posługując się różnego rodzaju znacznikami (markerami) molekularnymi, wykrywa polimorfizm organizacji i struktury genomowego DNA w obrębie gatunku. Przy czym źródłem wewnątrzgatunkowego polimorfizmu mogą być zarówno rekombinacje genetyczne, jak i spontaniczne mutacje. Typowanie genetyczne prowadzi do ustalenia indywidualnych wzorów molekularnych dla badanych szczepów, dzięki czemu możliwe jest określenie pokrewieństwa między nimi. Zdolność różnicowania (potencjał różnicujący) poszczególnych metod genotypowych zależy przede wszystkim od rodzaju i poziomu polimorfizmu, który wykrywają. Niski poziom zmienności genetycznej prątków kompleksu *M. tuberculosis* istotnie ogranicza możliwości ich różnicowania z użyciem metod molekularnych. Wyniki prowadzonych badań wskazują, że genomy gatunków wchodzących w skład

Adres do korespondencji: prof. dr n. med. hab. Jarosław Dziadek, Instytut Biologii Medycznej PAN, ul. Lodowa 106, 93–232 Łódź, e-mail: jdziadek@cbm.pan.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 15.03.2012 r.

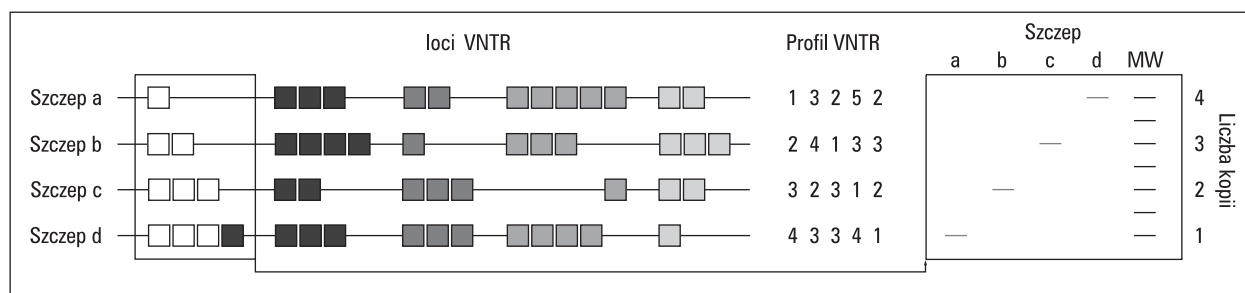
Copyright © 2012 Via Medica

ISSN 0867–7077

M. tuberculosis complex są wysoce konserwatywne, w odniesieniu do innych gatunków bakterii, a zmienność nukleotydowego polimorfizmu u tych drobnoustrojów ocenia się na 0,01–0,03% [6, 7]. Określenie sekwencji nukleotydowej genomu *M. tuberculosis* ujawniło stosunkowo dużą zawartość elementów powtarzających się, różniących się pod względem złożoności struktury, wielkości, lokalizacji i sekwencji nukleotydowej. W genomie mykobakterii zaobserwowano 2 główne typy powtórzeń: powtórzenia tandemowe (TR, *tandem repeats*) oraz powtórzenia rozproszone (IR, *interspersed repeats*). Do szczególnych sekwencji powtórzonych należą sekwencje insercyjne (IS, *insertion sequence*), które stanowią ruchome elementy genetyczne zdolne do przemieszczania się w obrębie genomu. Do najlepiej poznanych sekwencji insercyjnych występujących w obrębie *M. tuberculosis complex* należy sekwencja IS6110, po raz pierwszy opisana przez Thierry i wsp. [8, 9]. Sekwencja IS6110 występuje w różnej liczbie kopii i ma różną lokalizację w genomie poszczególnych gatunków i szczepów prątków. Liczba kopii sekwencji IS6110 w chromosomie prątków mieści się w przedziale 0–25 i uzależniona jest od częstości procesu transpozycji. Wspomniana sekwencja została wykorzystana jako specyficzny marker molekularny w typowaniu genetycznym szczepów *M. tuberculosis*, który polega na określeniu liczby kopii i ich rozmieszczeniu w genomie badanych szczepów. W metodzie tej, chromosomalny DNA poddawany jest trawieniu endonukleazą (powszechnie używany jest enzym PvuII) generującą odpowiednią liczbę fragmentów restrykcyjnych i rozdzielany w żelach agarozowych w wystandaryzowanych warunkach. Tak przygotowany DNA ulega hybrydyzacji z sondą, którą stanowi fragment DNA komplementarny do końca 3' IS6110, co pozwala na uzyskanie hybrydyzacyjnych wzorów prążkowych, gdzie uwidoczniony prążek reprezentuje pojedynczą kopię sekwencji inercyjnej [10]. Zastosowanie wewnętrznego markera wielkości oraz opracowanie komputerowych baz danych, deponujących wzory IS6110-RFLP, pozwala na porównywanie otrzymanych wzorów hybrydyzacyjnych dla szczepów analizowanych w różnych ośrodkach na świecie. Metoda ta odznacza się dużą powtarzalnością wyników i zdolnością głębokiego różnicowania genetycznego prątków gruźlicy. Jest uznawana za „złoty standard” w dochodzeniach epidemiologicznych gruźlicy. Różnicowanie prątków za pomocą IS6110-RFLP, pomimo wielu zalet, jest kosztowne, czasochłonne i ma pewne ograniczenia dotyczące pozyskiwania hodowli w celu izolacji dużej ilości DNA (2 mikrogramy). Również

przydatność metody jest ograniczona do szczepów posiadających więcej niż 5 kopii sekwencji inercyjnej [11, 12]. W genomie mykobakterii występuje szereg sekwencji repetytywnych, bogatych w pary G + C (PGRS, *polymorphic GC-rich repetitive sequence*), jak również krótkie sekwencje (DR, *direct repeats*), które są wykorzystywane do badania polimorfizmu prątków posiadających niewielką liczbę kopii sekwencji IS6110 [13, 14]. W celu szybkiej identyfikacji prątków, z pominięciem etapu hodowli bakterii, stosuje się metody oparte o reakcję amplifikacji DNA (reakcja łańcuchowa polimerazy [PCR, *polymerase chain reaction*]). Jednak wadą większości metod wykorzystujących reakcję PCR jest niski potencjał dyferencyjny, jak również brak powtarzalności wyników.

Jedną z najbardziej popularnych metod stosowanych w genotypowaniu prątków, a tym samym w badaniach epidemiologicznych prątków, jest technika *spoligotyping*. Metoda ta opiera się na amplifikacji chromosomalnego regionu DR, który obejmuje zmienną liczbę krótkich sekwencji powtórzonych DR, o długości 36 par zasad, rozdzielonych przez unikalne sekwencje rozdzielające (*spacers*), o długości 35–41 par zasad. Na zmienność w obrębie gatunku prątków wpływa liczba, położenie i rodzaj sekwencji rozdzielającej. Za polimorfizm regionu DR odpowiadają rearanżacje genetyczne typu delekcji lub duplikacji, powstające na drodze rekombinacji homologicznej zachodzącej pomiędzy sąsiadującymi lub oddalonymi regionami DR, transpozycja sekwencji inercyjnej IS6110, jak również poślizg polimerazy podczas replikacji DNA. W metodzie tej amplifikacji ulega cały region DR, a powstające produkty, o zmiennej wielkości, zawierają wszystkie regiony rozdzielające. Mieszanie takich amplikonów przenosi się na membranę nylonową ze związanymi kowalencyjnie oligonukleotydami i poddaje hybrydyzacji. Sygnały hybrydyzacyjne są uwidaczniane na kliszy rentgenowskiej na drodze chemiluminescencji (ryc. 1). Typowanie prątków metodą *spoligotyping* odznacza się wysoką powtarzalnością wyników, wynikającą z dużej stabilności regionu DR, łatwością ich interpretacji i porównywania z międzynarodową bazą danych SpolDB4 opisującą 1939 różnych spoligotypów zidentyfikowanych pośród szczepów *M. tuberculosis* pochodzących z całego świata. Mimo wielu zalet, metoda ta posiada mniejszą siłę różnicującą w porównaniu z metodą IS6110-RFLP, co wynika z badań pojedynczego *locus*, stanowiącego zaledwie 0,01% genomowego DNA prątka. Obecnie technika ta jest stosowana jako szybki test przesiewowy (*screening*) we wstępnych analizach epidemiologicznych kolekcji szczepów *M. tuberculosis* [15–18].



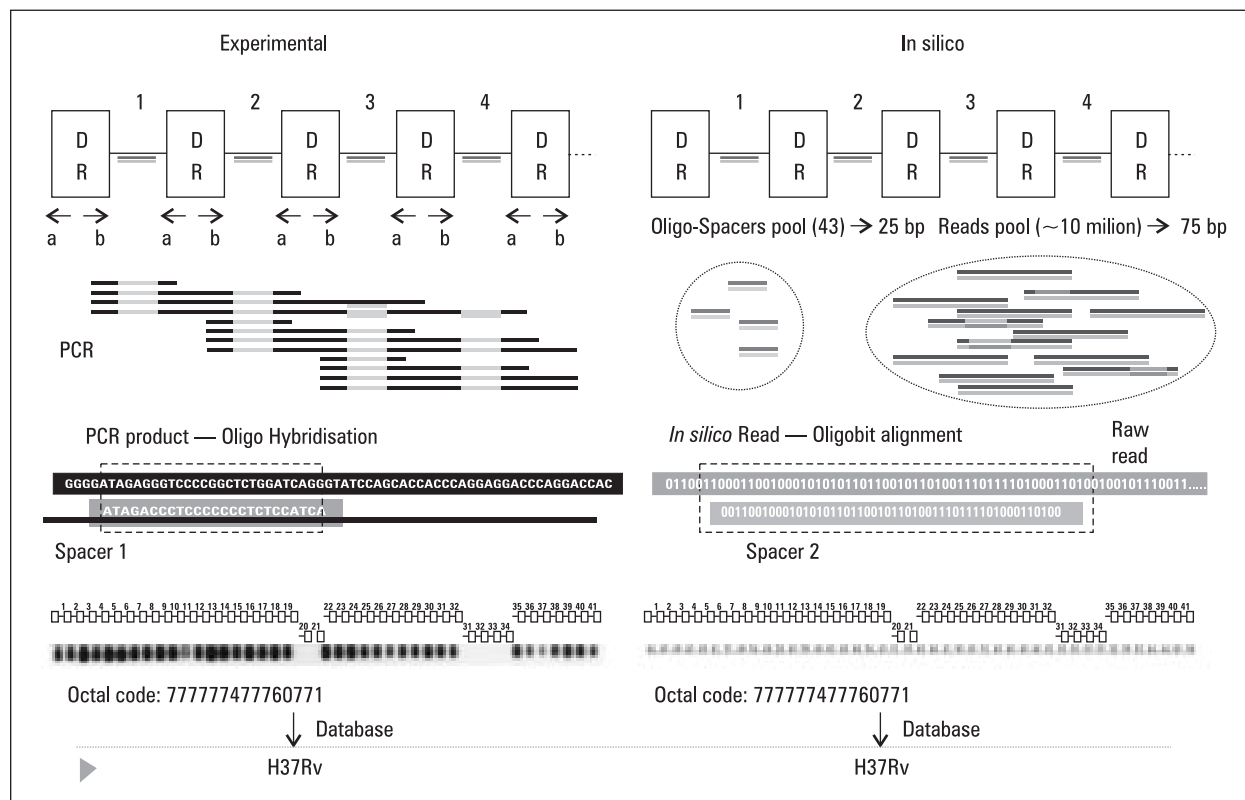
Rycina 1. Schemat metody spoligotypingu (źródło: <http://www.pathogenseq.org/spolpred>)

Figure 1. Scheme of spoligotyping method (from: <http://www.pathogenseq.org/spolpred>)

W ostatnich latach w genotypowaniu prątków coraz większą popularność zyskują metody opierające się na analizie zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (VNTR, *variable number of tandem repeats*) [19]. Regiony te składają się z wielokrotnie powtórzonych motywów o długości kilkunastu–kilkudziesięciu par zasad, których liczba jest zmienna pośród szczepów tego samego gatunku, co odpowiada strukturalnie sekwencjom minisatelitarnym obecnym w chromosomach eukariotycznych. W genomie *Mycobacterium* największą grupę motywów VNTR stanowią 46–100-nukleotydowe sekwencje MIRU (*mycobacterial interspersed repetitive units*). Spośród 41 rozpoznanych loci zawierających sekwencje powtórzone MIRU, 15 o największej zmienności zostało wybranych do genotypowania prątków. Metoda MIRU-VNTR polega na amplifikacji poszczególnych loci z zastosowaniem odpowiednich oligonukleotydowych sekwencji starterowych i rozdzieleniu elektroforetycznym w żelu agarozowym powstałych produktów PCR. W zależności od liczby powtórzeń jednostki rdzeniowej otrzymuje się produkty o różnej wielkości. Obliczona dla każdego loci liczba powtórzeń motywu MIRU pozwala na katalogowanie wyników w postaci 15-cyfrowego kodu MIRU-VNTR [20, 21] (ryc. 2). Opisaną metodę charakteryzuje wysoka czułość i powtarzalność wyników, a także duży stopień różnicowania analizowanych szczepów, niejednokrotnie porównywaną z kosztowną i czasochłonną techniką IS6110-RFLP oraz względna łatwość i krótki czas analizy [22, 23]. Jednak w dużych populacjach, różnicowanie szczepów wyłącznie metodą MIRU-VNTR prowadzi do fałszywych interpretacji powiązań epidemiologicznych pomiędzy chorymi [24]. Z tego względu połączenie MIRU-VNTR z innymi metodami, na przykład spoligotypingu, może pomóc w ustaleniu korelacji epidemiologicznych wśród chorych [25, 26].

Z uwagi na fakt, iż gruźlica pozostaje wciąż jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych XXI

wieku, bardzo ważny jest właściwie prowadzony nadzór nad tą chorobą. Nadzór ten, poza utrzymaniem wczesnego wykrywania choroby, jak i prawidłowego leczenia, powinien obejmować także śledzenie dróg transmisji zakażenia w danym środowisku społecznym. Początkowo dochodzenia epidemiologiczne opierały się na dokładnym wywiadzie lekarskim i porównywaniu wzorów oporności izolowanych szczepów *M. tuberculosis* na podstawowe leki przeciwprątkowe oraz cechach biochemicznych, fenotypowych i serologicznych prątków [27, 28]. Obecnie w badaniach epidemiologicznych gruźlicy coraz częściej stosuje się metody typowania genetycznego polegające na różnicowaniu między szczepami prątków na podstawie polimorfizmu genomowego DNA wynikającego z obecności powtarzających się sekwencji. Wykorzystanie technik molekularnego typowania prątków umożliwia nie tylko określenie podobieństw pomiędzy szczepami izolowanymi od różnych osób, ale również śledzenie źródeł i dróg transmisji zakażeń, poprzez rozróżnienie, czy gruźlica jest wynikiem reaktywacji zakażenia latentnego, czy pochodzi z bieżącej transmisji oraz czy doszło do zakażenia nowymi szczepami, czy też nawrót choroby jest skutkiem wcześniejszego zakażenia. Dodatkowo różnicowanie genetyczne szczepów umożliwia wykrycie zakażeń szpitalnych, laboratoryjnych, krzyżowych kontaminacji, a także pozwala monitorować rozprzestrzenianie się identycznych bądź spokrewnionych genetycznie szczepów *Mycobacterium* [29, 30]. Badanie pokrewieństw genetycznych pomiędzy szczepami umożliwia prześledzenie transmisji gruźlicy w obrębie różnych grup społecznych, między innymi wśród bezdomnych, więźniów czy osób hospitalizowanych. Dla prześledzenia dróg transmisji szczepów *M. tuberculosis* niezbędne jest jednak korzystanie zarówno z nowoczesnych technik biologii molekularnej, jak i klasycznej epidemiologii opartej o dogłębny wywiad lekarski.



Rycina 2. Schemat przedstawiający metodę MIRU-VNTR [21]

Figure 2. Scheme of MIRU-VNTR typing

W pracy Brzezińskiej i wsp. [31] zatytułowanej „Molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród polskich więźniów chorych na gruźlicę w latach 2004–2008. Badania wstępne.” podjęto się analizy genetycznej 57 szczepów *M. tuberculosis* wyizolowanych od chorych osadzonych w różnych więzieniach w Polsce z potwierdzoną gruźlicą. Dane WHO wykazują, że stopień zapadalności na gruźlicę w populacji więziennej jest 10–100 razy większy niż wśród osób przebywających na wolności. Problem gruźlicy w więzieniach spowodowany jest wieloma czynnikami, do których zaliczyć należy: przepełnienie cel więziennych, zła sytuacja socjalna, alkoholizm, narkotyki, współistniejące choroby (HIV, WZW) itp. [32]. Jednak brak dostępu do dokumentacji lekarskiej więźniów w znacznym stopniu utrudnia ocenę zachorowalności na gruźlicę w tej grupie. Z badań przeprowadzonych w ośrodkach więziennych w 13 krajach Europy Zachodniej w 2003 roku wynika, że wskaźnik zapadalności na gruźlicę wynosił 90/100 tysięcy, zaś w Polsce był znacząco wyższy 238,7/100 tysięcy. Zbliżone wartości zapadalności na gruźlicę obserwowano w kolejnych latach włącznie z 2010 rokiem (260/100 tys.) [33]. Z tego względu odpowiednio szybka i skuteczna diagnostyka gruźlicy

w obrębie tej populacji może przyczynić się do zapobiegania i zwalczania transmisji choroby. W prezentowanej pracy wykorzystano 2 metody molekularne: *spoligotyping* i MIRU-VNTR, oparte na reakcji amplifikacji regionów powtarzających się w genomowym DNA, w celu wykazania zróżnicowania pomiędzy szczepami *M. tuberculosis* wyizolowanymi od 57 chorych więźniów z terenu Polski. Metoda *spoligotyping* wykazała, że wśród badanych szczepów, 24 (42%) posiadały unikalne wzory genetyczne, zaś pozostałe 33 szczepy (57,9%) przynależały do 7 rodzin molekularnych (szczepy klastrujące się), co mogłoby dowodzić o ich podobieństwie genetycznym [31]. W kolejnym etapie, szczepy przynależące do rodzin molekularnych zostały poddane analizie metodą bardziej różnicującą MIRU-VNTR, co pozwoliło na identyfikację unikalnych wzorów wśród 33 szczepów tworzących klastry [31]. Powyższe wyniki świadczą o braku występowania transmisji gruźlicy w badanej grupie więźniów. Dlatego też celowe będzie wykonanie dalszych badań, obejmujących większą grupę więźniów oraz osób przebywających na wolności, które miały kontakt z osadzonymi (rodzina, znajomi itp.), zmierzających do wykrycia źródła transmisji poprzez porównanie analiz mo-

lekularnych otrzymanych dla badanej grupy więźniów i prześledzenia ich kontaktów z chorymi z odpowiednich regionów Polski.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

- World Health Organization. Tuberculosis, Genewa, Switzerland, 2002, WHO fact sheet, no.104, August 2002.
- World Health Organization. Global tuberculosis control 2001, Genewa, Switzerland, WHO/CDC/TB/2001.287.
- Moro M.L., Gori A., Errante I. i wsp. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. *AIDS* 1998; 12: 1095–1102.
- van Rie A., Warren R., Richardson M. i wsp. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med*, 1999; 341: 1174–1179.
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J. i wsp. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537–544.
- Frothingham R., Hills H.G., Wilson K.H. Extensive DNA sequence conservation throughout the Mycobacterium tuberculosis complex. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1639–1643.
- Gutacker M.M., Smoot J.C., Migliaccio C.A. i wsp. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 2002; 162: 1533–1543.
- Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D. i wsp. IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 188.
- Thierry D., Brisson-Noel A., Vincent-Levy-Frebault V. i wsp. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 2668–2673.
- van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T. i wsp. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 406–409.
- Barlow R.E., Gascoyne-Binzi D.M., Gillespie S.H. i wsp. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 Mycobacterium tuberculosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 2453–2457.
- Yang Z.H., Ijaz K., Bates J.H. i wsp. Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of mycobacterium tuberculosis strains having few copies of IS6110. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 3572–3576.
- De Wit D., Steyn L., Shoemaker S. i wsp. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 2437–2441.
- van Soolingen D., de Haas P.E., Hermans P.W. i wsp. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 1987–1995.
- Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R. i wsp. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 2607–2618.
- Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. i wsp. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 907–914.
- Goguet de la Salmoniere Y.O., Li H.M., Torrea G. i wsp. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2210–2214.
- Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L. i wsp. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 23.
- Supply P., Mazars E., Lesjean S. i wsp. Variable human mini-satellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome. *Mol. Microbiol.* 2000; 36: 762–771.
- Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998; 144 (Pt 5): 1189–1196.
- Jagielski T., Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z. Typowanie genetyczne prątków Mycobacterium tuberculosis. Przegląd ważniejszych technik badawczych. *Pol. Merk. Lek.* 2010; XXIX: 206–211.
- Supply P., Lesjean S., Savine E. i wsp. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3563–3571.
- Hawkey P.M., Smith E.G., Evans J.T. i wsp. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 3514–3520.
- Cowan L.S., Diem L., Monson T. i wsp. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 688–695.
- Krawczyk M., Brzostek A., Gorna A. i wsp. Epidemiological analysis of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Lodz, Poland. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2011; 15: 1252–1258.
- Blackwood K.S., Wolfe J.N., Kabani A.M. Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 5001–5006.
- Roman M.C., Sicilia M.J. Preliminary investigation of Mycobacterium tuberculosis biovars. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 1015–1016.
- Grange J.M., Laszlo A. Serodiagnostic tests for tuberculosis: a need for assessment of their operational predictive accuracy and acceptability. *Bull World Health Organ.* 1990; 68: 571–576.
- Vynnycky E., Nagelkerke N., Borgdorff M.W. i wsp. The effect of age and study duration on the relationship between 'clustering' of DNA fingerprint patterns and the proportion of tuberculosis disease attributable to recent transmission. *Epidemiol. Infect.* 2001; 126: 43–62.
- Vynnycky E., Fine P.E. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol. Infect.* 1997; 119: 183–201.
- Brzezińska S. i wsp. Molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród polskich więźniów chorych na gruźlicę w latach 2004–2008. Badania wstępne; *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2012; 81, 3: 209–213.
- van't Hoff G., Fedosejeva R., Mihailescu L. Prisons' preparedness for pandemic flu and the ethical issues. *Public Health* 2009; 123: 422–425.
- Korzeniewska-Koseła M. Gruźlica i choroby układu oddychowego w Polsce w 2010 roku. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc Warszawa 2011.