



Tartalom:

Multirezisztens *Acinetobacter baumannii* klinikai izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata

Pászti Judit, Jánvári Laura, Tóth Ákos

Veszélyes kórokozó baktériumok diagnosztikájának aktuális kérdéseiről I. Alapismeretek és a bakteriológiai laboratóriumok együttműködése *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* és *Burkholderia pseudomallei*

Herpay Mária, Szabó Zsuzsanna, Pályi Bernadett

Invazív megbetegedéseket okozó *Streptococcus pneumoniae* szerotípusok 2008-2010 között.

(Az Országos Epidemiológiai Központba beküldött törzsek szerotipizálási adatai alapján)

Tirczka Tamás, Berta Brigitta

A pertussis atípusos megjelenésű formája, és a laboratóriumi diagnosztika fontossága

Irodalmi összefoglaló

Ferenczné Paluska Ildikó

A Mikrobiológiai Körlevél ezen számának megjelentetését részben a
Bio-Science Kft. támogatta



Alapító szerkesztők: Dr. Füzi Miklós (PhD)
Dr. Gacs Mária
Szerkesztő: Dr. Gacs Mária
Felelős szerkesztő: Dr. Visontai Ildikó
Operatív szerkesztő: Tirczka Tamás
Tóth Ákos

**A Mikrobiológiai Körlevelek az OEK honlapján
www.oek.hu elérhetőek.**

Multirezisztens *Acinetobacter baumannii* klinikai izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata

Pászti Judit, Jánvári Laura, Tóth Ákos

Bevezetés

Az *Acinetobacter* genus taxonómiája jelentős változáson ment keresztül az utóbbi 30 évben. Jelenleg a fenotípusosan is jellemezhető fajok mellett többet csak genotipizálási módszerekkel lehet elkülöníteni. A klinikai bakteriológiában a legjelentősebb képviselőik az *Acinetobacter calcoaceticus* - *baumannii* komplex tagjai. Ebbe a csoportba jelenleg négy species tartozik az *A. calcoaceticus*, az *A. baumannii*, az *Acinetobacter* genospecies 3 és az *Acinetobacter* genospecies 13TU, azonban csak a három utóbbit tekintik klinikailag jelentősnek. A négy faj biokémiai elkülönítése nehéz, biztosan csak genetikai módszerekkel végezhető el. Az *A. baumannii* egyik jellegzetessége a kromozómáisan kódolt *bla*_{OXA-51} csoportba tartozó β -laktamáz gén hordozása, mely a másik háromtól jól elkülöníti (Peleg és mtsai, 2008). Vizsgálatunkban ennek a génnek a hordozását tekintettük fontos identifikáló bélyegnek (multiplex PCR módszer (Woodford és mtsai, 2006)).

Európa számos országában jelentős egészségügyi problémát jelent a kórházi fertőzéseket okozó *A. baumannii*. Már az 1980-s évek elejétől Angliában, Franciaországban, Olaszországban, Spanyolországban, Hollandiában okoztak kórházi járványokat, azonban az elmúlt évtizedben nemcsak Európában, hanem világszerte a multirezisztens *A. baumannii* gyakoriságának emelkedéséről számolnak be. A különböző európai országokban elvégzett molekuláris epidemiológiai vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a kontinensen három epidémiás klón elterjedése igazolható: Európai klón I (EU I), Európai klón II (EU II) és Európai klón III (EU III) (Peleg és mtsai, 2008; Zarrilli és mtsai, 2009). Az tipizáló módszerek (pl. PFGE, AFLP) különbözőségei és korlátai miatt azonban nehéz volt az eredményeket egyeztetni.

Diancourt és mtsai 154 (korábban már jellemzett) *A. baumannii* törzs szekvencia típusát határozták meg multi-lókuszos szekvencia tipizálás (MLST) módszerével. Ez a törzsgyűjtemény nemcsak európai, hanem észak-amerikai, dél-amerikai és ausztráliai izolátumokat is tartalmazott. Vizsgálati eredményeik igazolták, hogy a korábban EU I, EU II és EU III-ként meghatározott nemzetközi epidémiás klónok megfeleltethetőek a CC1, CC2 és CC3 klonális komplexeknek, és ezek más kontinenseken is jelen vannak (Diancourt és mtsai, 2010).

Az *A. baumannii* minden, az általuk okozott fertőzések kezelésére alkalmazott antibiotikum csoporttal szemben rendelkezhet rezisztencia mechanizmussal. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájára jellemző, hogy sokszor többféle mechanizmus kombinálódik egyszerre, a

legjelentősebb mégis a β -laktamáz termelés. A kromoszómáisan kódolt AmpC-típusú β -laktamáz termelése mellett számos szerzett β -laktamáz jelenlétét is leírták már ebben a speciesben: pl. kiterjedt-spektrumú β -laktamázok, metallo- β -laktamázok, különböző OXA-típusú β -laktamázok (ezek eltérő szubsztrát-spektrummal rendelkezhetnek). Utóbbiak közé tartoznak az *A. baumannii*-ban jelenleg leggyakrabban leírt, szerzett karbapenemázok (Carbapenem-Hydrolyzing class **D** β -Lactamases – CHDL), melyeket szekvencia homológia alapján 3 csoportba lehet sorolni: OXA-23-, OXA-24- és OXA-58-csoport. A magas szintű karbapenem rezisztencia kialakításához általában szükséges, hogy a génhez valamilyen inszerciós szekvencia is társuljon (pl. *ISAbal*, *ISAbal2*, *IS18*). Az OXA-58-csoportba tartozó géneket hordozó *A. baumannii* törzsek elsősorban Európában terjedtek el, az utóbbi időben azonban az OXA-23-termelők gyakorisága ugrásszerűen emelkedett (Mugnier és mtsai, 2010; Peleg és mtsai, 2008; Poirel és mtsai, 2010).

Az aminoglikozidokkal szemben is többféle rezisztencia mechanizmussal védekezhetnek. Az aminoglikozid módosító enzimek mellett napjainkban bizonyos 16S rRNS metiláló enzimek terjedése okoz problémát. Ezek a 16S rRNS metiláló enzimek (*A. baumannii*-ban pl. *rmtB*, *rmtC* és *armA* gének kódolta enzimek) ugyanis teljes keresztrezisztenciát biztosítanak a jelenleg forgalomban lévő összes aminoglikoziddal szemben (Doi és Arakawa, 2007).

A fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulásáért elsősorban a giráz és topoizomeráz IV génjünkben történő mutációk, illetve efflux pumpák felelősek. Mint számos más multirezisztens Gram-negatív kórokozó esetében, az acinetobacterek okozta fertőzéseknél is, előtérbe kerültek a terápiában a polymyxinek. Ezekkel szemben rezisztencia ritkán fordul elő, és az azok hátterében meghúzódó mechanizmusok is kevésbé ismertek (Peleg és mtsai, 2008).

Az OEK Bakteriológiai I és a Fágtypizálási és molekuláris epidemiológiai osztályán 2005 óta foglalkozunk rutinszerűen a multirezisztens *A. baumannii* (MACI) izolátumok részletes vizsgálatával. A Nemzeti Bakteriológiai Surveillance (NBS) keretében az adatszolgáltató klinikai mikrobiológiai laboratóriumokból származó adatok elemzése mellett, az egész ország területéről beküldött törzseket gyűjtjük további vizsgálatokhoz. A részletes vizsgálatok célja az antibiotikum rezisztencia, a rezisztencia mechanizmus(ok) azonosítása fenotípusos és genetikai vizsgálatok alapján. Emellett PFGE vizsgálattal meghatározzuk a kórokozó terjedésében szerepet játszó fontosabb klónokat, valamint halmozott előfordulás, járvány gyanúja esetén tipizáljuk a betegeket, tünetmentes hordozók váladékaiból és környezeti mintákból izolált *A. baumannii* törzseket a fertőző forrás azonosítása céljából. Az összesített (rezisztencia, PFGE) adatokkal folyamatosan bővítjük az adatbázist (Nemzeti

Tipizálási Adatbázis), melynek segítségével meghatározhatóak a már előfordult, vagy az újonnan felbukkanó (PFGE) típusok.

Hasonlóan a nemzetközi tapasztalatokhoz az Országos Epidemiológiai Központ gondozásában működő Nemzeti Nozokomiális Surveillance Rendszerben is megfigyelhető a MACI esetek emelkedő száma. A 2007-ben jelentő 78 kórházban összesen 84 beteg fertőződött meg multirezisztens *A. baumannii*-val, ez a szám 2009-ben 230 (81 jelentő intézmény), míg 2010-ben már 352 volt (90 jelentő intézmény) (www.oek.hu).

A NBS adatai alapján megfigyelhető az is, hogy az invazív mintákból izolált karbapenem rezisztens *A. baumannii*/*A. calcoaceticus* törzsek aránya évről évre emelkedik. Míg 2006-ban a hemokultúrából származó *A. baumannii*/*A. calcoaceticus* izolátumok (n=364) 1,6 %-a volt imipenem rezisztens (a kiadott eredményeket alapul véve), addig 2009-ben (n=240) ez az arány 41%-ra emelkedett (www.oek.hu). (Megjegyzés: Az NBS adatainak feldolgozásakor az „*A. calcoaceticus*” kiadott eredményt is figyelembe vettük, mivel valószínűleg az *A. baumannii*-t az *A. calcoaceticus*-tól nem lehetett megkülönböztetni).

2007 és 2010 közötti időszakban 241 *A. baumannii* izolátumot küldtek be az OEK-ba az együttműködő laboratóriumok további vizsgálatra. Ezek az ország 11 megyéjében lévő 15 egészségügyi intézményből (152 izolátum) és Budapest 17 egészségügyi intézményéből (89 izolátum) származtak.

Anyagok és módszerek

Jelen írásunkban a 2009-2010-ben tipizálásra és/vagy karbapenem rezisztencia mechanizmus megerősítésére az OEK-be küldött 183 multirezisztens *A. baumannii* törzs molekuláris tipizálásának és karbapenem rezisztencia vizsgálatának eredményeit mutatjuk be. A 183 törzs kiválasztásakor figyelembe vettük, hogy egy beteghez egyféle PFGE-típusból csak egy törzs tartozzon.

Az izolátumok 9 megye (Budapest, Somogy, Borsod-Abaúj-Zemplén megyéből a 80%) 26 intézményéből (52%-a 3 megye 6 intézményből, 40%-a Budapest 12 intézményéből) kerültek beküldésre. A törzsgyűjtemény részét képezték az ebben az időszakban lezajlott járványokból származó törzsek is (2009-2010-ben 8 járvány) (1. táblázat).

1. táblázat: OEK-ban tipizált *A. baumannii* törzsek száma megyék szerinti bontásban.

Megye	Beküldött izolátumok száma (tisztított adat)		Összesen
	2009. év	2010. év	
Budapest	26	47	73
Somogy megye	31	24	55
Borsod-Abaúj-Zemplén megye	4	25	29
Pest megye	-	11	11
Győr-Moson-Sopron megye	4	-	4
Békés megye	2	1	3
Szabolcs-Szatmár-Bereg megye	-	3	3
Heves megye	-	2	2
Veszprém megye	2	-	2
Fejér megye	1	-	1
Összesen	70	113	183

Anyagunkban légúti mintából izolált törzsek fordultak elő leggyakrabban (n=73), de jelentős volt a sebváladékból (n=55) és hemokultúrából izolált törzsek száma (n=31) is. Az anyag típusonkénti megoszlás is mutatja, hogy többségében súlyos fertőzésekből származtak ezek az izolátumok. Három járvány során az együttműködő laboratóriumok környezeti mintából izolált *A. baumannii* törzset is beküldtek tipizálásra.

A karbapenem rezisztencia hátterében álló mechanizmus vizsgálatára kombinált korong teszt módszereket (Tóth és mtsai, 2010), valamint különböző karbapenemáz génekre (pl. metallo- β -laktamázok, OXA-típusú karbapenemázok) tervezett PCR vizsgálatokat alkalmaztunk (Ellington és mtsai, 2007; Tóth és mtsai, 2010; Woodford és mtsai 2006).

A 183 izolátum makrorestrikciós profilját PFGE módszerrel vizsgáltuk. (ARPAC, Bannermann és mtsai, 1995). A bakteriális kromozómát *ApaI* restrikciós endonukleázzal emésztettük, majd CHEF DRII (Bio-Rad) PFGE készülékben elektroforetizáltuk, és ethidium-bromidos festést követően UV megvilágítás mellett detektáltuk. A géleképeket Fingerprinting II (Bio-Rad) szoftver segítségével értékeltük. Az izolátumok összehasonlítása UPGMA matematikai séma alapján történt.

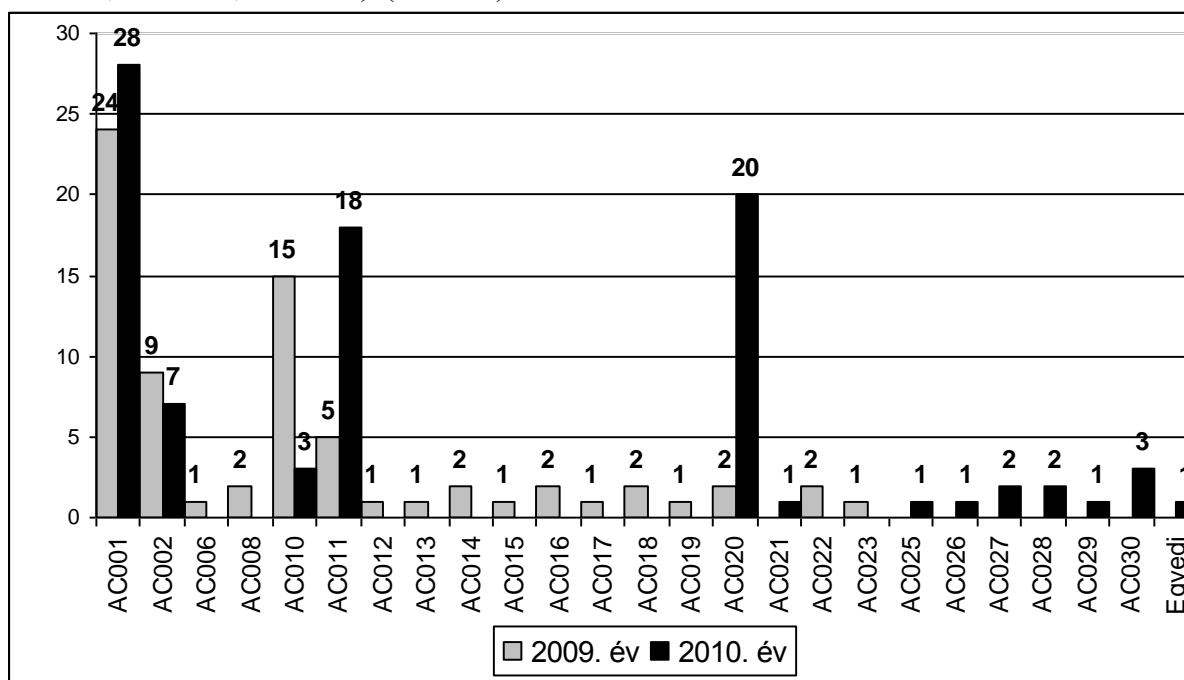
Ez a makrorestrikciós analízis alkalmas mind az adott patogén által okozott nozokomiális fertőzések járványügyi kivizsgálására, mind az epidémiás klónok megjelenésének, molekuláris evolúciójának és földrajzi elterjedtségének nemzeti és nemzetközi felmérésére. Mivel a multirezisztens *A. baumannii* populációs struktúrája erősen klonális, ezért a **járványok esetében** a törzsek

típusba történő besorolásakor (PFGE típus: pl. AC001) **85% hasonlósági szintet (1,0% optimalizáció, 1,0% tolerancia)** (Grosso és mtsai, 2011), míg az **epidemiás klónok (EU I, EU II, EU III) azonosításához 70% hasonlósági szintet (0,2% optimalizáció, 1,2% tolerancia)** alkalmaztunk (Turton és mtsai, 2007). A hazai törzsek PFGE típusait (1% opt., 1% tol., 85% hasonlóság) AC001-től kezdődően jelöltük, mivel nemzetközileg egységes nomenklatúra nem áll rendelkezésre.

A hazai izolátumok klonalitásának további vizsgálatára MLST módszert alkalmaztunk (Diancourt és mtsai, 2010).

Eredmények és megbeszélés

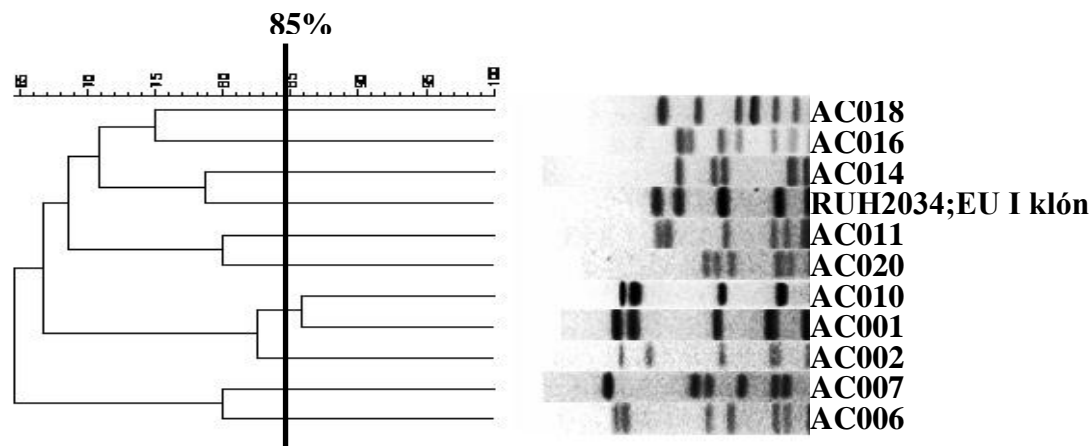
Összesen 25 különböző PFGE típusba lehetett sorolni az izolátumokat, azonban 82%-uk mindössze csak 5 féle PFGE típusba tartozott (AC001, AC002, AC010, AC011, AC020) (1. ábra).



1. ábra A. baumannii törzsek PFGE típus szerinti megoszlása 2009-2010 között

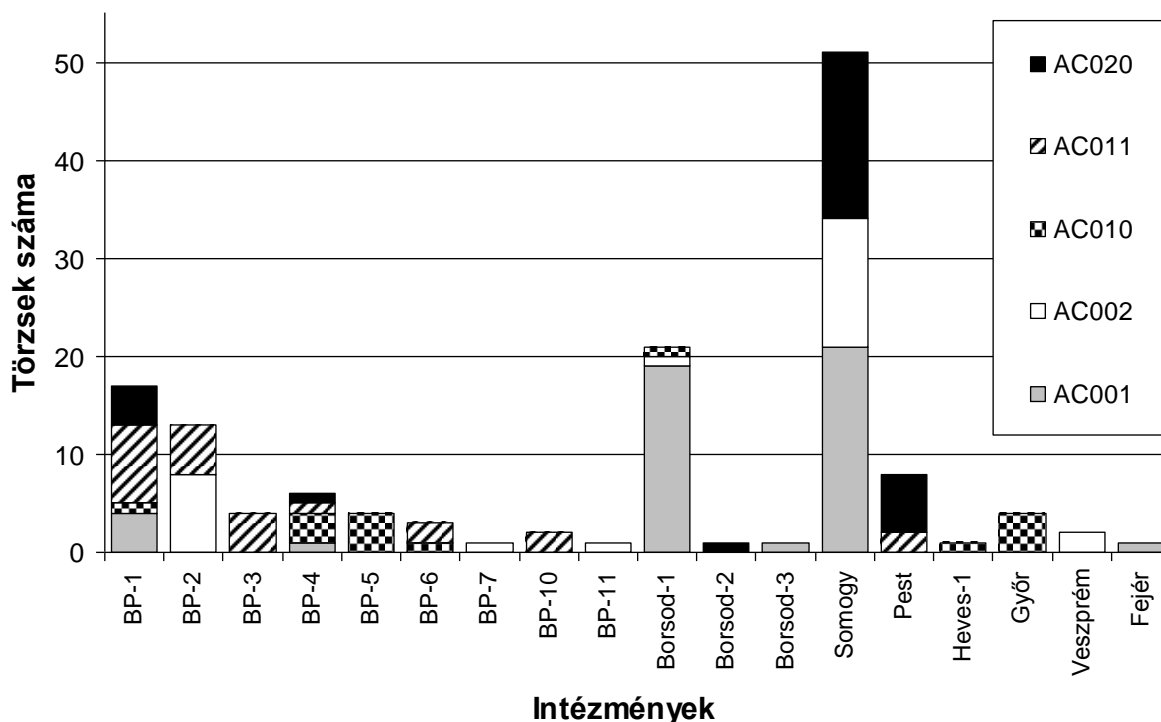
Az egyes típusok évenkénti gyakorisága az AC001 típuson kívül jelentősen változott. 2009-ben az AC001 mellett a második leggyakoribb típus az AC010 volt, az AC002 a harmadik helyen állt. 2010-ben a második leggyakoribb típus az AC020 lett, melyet az AC011 követett. Az AC001 típus már 2008-ban Somogy megyében előfordult egy járvány során, míg az AC002, AC010, AC011 és AC020 típusok 2009. év előtt nem fordultak elő a tipizálásra beküldött törzsek között (nem közölt adatok).

A járványok során izolált törzsek makrorestrikciós mintázatát **1,0%-os optimalizáció, 1,0%-os tolerancia** mellett hasonlítottuk össze. A **85%-os hasonlósági szint** alapján meghatározott PFGE típusok összhangban voltak az epidemiológiai vizsgálatokkal, és alátámasztották az esetek időben, térben való összefüggését. A járványtól független izolátumok is jól elkülönültek (2. ábra).



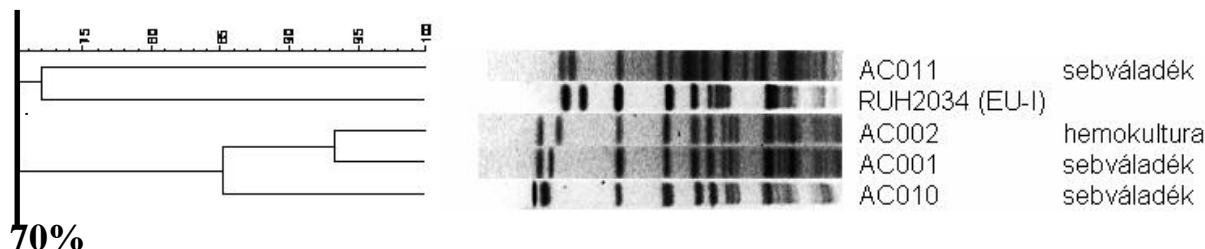
2. ábra Különböző PFGE típusok *ApaI* restrikciós enzimmal kapott makrorestrikciós mintázatai és családfája (Opt.:1,0%, Tol.: 1,0%)

Az AC001 és AC002 egy-egy nagyobb járványt okozott, míg az AC010, AC011 típusokat kisebb halmazódásból, több intézményből is izolálták. Az AC020 3 forrásból, nagyobb számban 2010-ben bukkant fel.



3. ábra 2009-2010 között vizsgált *A. baumannii* törzsek megoszlása intézmények és PFGE típusok szerint

Ezt alkalmazva a hazai gyakori PFGE típusok makrorestrikciós profil vizsgálatának eredményét az 5. ábrán mutatjuk be. A vizsgálatnál alkalmazott RUH2034 jelű *A. baumannii* kontroll törzs az EU-I klón képviselője.



5. ábra EU I klónba tartozó *A. baumannii* törzsek PFGE típusai

Az ábrán látható, hogy ezekkel a értékelési paraméterekkel a hazai leggyakoribb PFGE típusok valamennyien az EU-I klónba sorolhatók. Elmondható, hogy az utóbbi 2 évben a járványokat ez az elterjedt klón okozta.

A karbapenem rezisztencia genetikai hátterének vizsgálatát 113 reprezentáns izolátum esetében végeztük el. A vizsgált törzsek – a ritkán előforduló PFGE típusú törzseket is beszámítva – 74%-ában az OXA-23-csoportú (*bla*_{OXA23-like}) β-laktamáz gének, míg a 26%-ában az OXA-58-csoportú (*bla*_{OXA58-like}) β-laktamáz gének jelenlétét lehetett kimutatni. Metallo-β-laktamáz termelő izolátum nem volt.

2009-ben még csak elvétve fordult elő OXA-23 csoportú karbapenemáz-termelő törzs (7%), azonban 2010-ben már dominánssá vált ez a típus. Ennek egyik oka, hogy a 2009-ben már elterjedt PFGE típusokba (AC001, AC002) tartozó izolátumok 2010-ben OXA-23 csoportú karbapenemáz gént hordozó változatai is megjelentek, míg másik oka, hogy újabb klónok is teret hódítottak (AC011, amelybe 2010-ben az izolátumok 17%-a tartozott). Az AC011 típusú törzsek valamennyien *bla*_{OXA-23-like} hordozók voltak, a többi gyakori PFGE típusba tartozó törzsek között *bla*_{OXA-23-like} és *bla*_{OXA-58-like} hordozó egyaránt előfordult. További nyolcféle, sporadikusan előforduló PFGE típus is *bla*_{OXA-23-like} hordozónak bizonyult.

Európa több országában is hasonló tapasztalatokról számoltak be. A *bla*_{OXA-23-like} gének megjelentek korábban *bla*_{OXA-58-like} termelő törzsekben, és gyorsan domináns típusokká váltak (Coelho és mtsai, 2006a; Coelho és mtsai, 2006b; Mugnier és mtsai, 2010).

Számos tanulmány foglalkozott azzal a kérdéssel, hogy miért pont ezek a klónok terjedhettek el a kórházi környezetben, és miért ezek váltak sikeres kórokozóvá. Mindaddig nem sikerült erre egyértelmű magyarázatot találni. Egyes elméletek szerint csak néhány *A. baumannii* törzs volt képes ezt a szűk életteret meghódítani, és ezért okozza csak néhány klón a noszokomiális fertőzések túlnyomó többségét. A sikeres klónok és más genotípusok összehasonlításakor azonban nem találtak jelentős különbséget pl. a

fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztencia, a biofilmképző képesség vagy az emberi sejtekhez való adhézió képessége között. Ennél fogva az antibiotikum rezisztencia jelentheti a nemzetközi klónok evolúciós sikerességének a kulcsát. Elképzelhető, hogy az idegen genetikai elemek felvételére való nagyobb hajlandóság áll a háttérben, azonban ennek a kérdésnek a tisztázása még várat magára. A jelenlegi állapot kialakulásának magyarázatára is léteznek egymástól eltérő elméletek: így lehet, hogy érzékeny klónok terjedtek el, majd megszereztek különböző rezisztenciákat és egyéb más, virulenciát fokozó géneket, de az is lehet, hogy a már rezisztens klónok adaptálódtak a kórházi környezethez. (Diancourt és mtsai, 2010). Lehetséges, hogy a két folyamat együttesen volt jelen és alakította ki a mai helyzetet.

Összefoglalás

- Az utóbbi évtizedben világszerte jelentősen emelkedett a nozokomiális fertőzéseket okozó, karbapenem rezisztens *A. baumannii* izolátumok előfordulása, s ez Magyarországon is megfigyelhető a surveillance rendszerek adatai alapján (NBS, NNSR);
- PFGE vizsgálatokkal (tolerancia:1,0%, optimalizáció 1,0%, és 85% hasonlósági szint) öt gyakori (járványokat is okozó) típust azonosítottunk (AC001, AC002, AC010, AC011, AC020);
- A PFGE mintázat ettől eltérő (0,2% tolerancia, 1,2% optimalizáció és 70% hasonlósági szint melletti) értékelése alkalmas volt a hazai törzsek EU klónokba sorolására, melyet szekvencia alapú módszerekkel is alátámasztottunk. Ez alapján a vizsgált időszakban a hazai törzsek többsége az EU I klónba (CC1 komplexbe) tartozónak bizonyult;
- Reprezentáns törzsek vizsgálata alapján a karbapenem rezisztens *A. baumannii* törzsek mindegyike OXA-típusú karbapenemáz gént hordozott, melyek között a leggyakoribb a *bla*_{OXA-23-like} volt.
- Az antibiotikum rezisztencia elleni küzdelem két fontos pilléren nyugszik: a higiénés szabályok betartásán és a megfelelő, körültekintő antibiotikum alkalmazáson. Előbbivel a rezisztens klónok terjedése ellen, míg az utóbbival az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciák megjelenése, és elterjedése ellen lehet küzdeni. Úgy tűnik, az *Acinetobacter baumannii* epidémiás klónok elterjedésének megakadályozásában mindkét tevékenységnek kulcsszerepe van.

Irodalom

1. **Bannerman TL, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM.** (1995) Pulsed-field gelelectrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 33: 551-5.
2. **Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D.** (2006a) Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 756-8.
3. **Coelho JM, Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, Woodford N, Warner M, Palepou MF, Pike R, Pitt TL, Patel BC, Livermore DM.** (2006b) Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* 44: 3623-7.
4. **Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S.** (2010) The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One.* 5: e10034.
5. **Doi Y, Arakawa Y.** (2007) 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 45: 88-94.
6. **Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N.** (2007) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 59: 321-2.
7. **Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef AP, Asensi MD, Peixe L.** (2011) OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother.* 66: 62-5.
8. **Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H.** (2010) Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 65: 233-8.
9. **Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P.** (2010) Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis.* 16:35-40.
10. **Peleg AY, Seifert H, Paterson DL.** (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 21: 538-82.
11. **Poirel L, Naas T, Nordmann P.** (2010) Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 24-38.
12. **Tóth Á, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J.** (2010) Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29: 765–767.
13. **Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL.** (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 13: 807-15.
14. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM.** (2006) Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 27: 351-3.
15. **Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A.** (2009) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries.* 3: 335-41.

Veszélyes kórokozó baktériumok diagnosztikájának aktuális kérdéseiről I.

Alapismeretek és a bakteriológiai laboratóriumok együttműködése

Bacillus anthracis, *Brucella* spp., *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* és *Burkholderia pseudomallei*

Herpay Mária, Szabó Zsuzsanna, Pályi Bernadett

Bevezetés

A biológiai tényezők hatásának kitett munkavállalók egészségének védelmére vonatkozó, 61/1999. (XII.1.) EüM rendelet (1) szabályozza az egészséget nem veszélyeztető és biztonságos munkavégzés személyi, tárgyi és szervezeti feltételeit a szervezeten munkát végzők egészségének, munkavégző képességének megóvása és a munkakörülmények humanizálása érdekében, megelőzve ezzel a munkabaleseteket és a foglalkozással összefüggő megbetegedéseket. A rendelet tartalmazza a mikroorganizmusok I.–IV. veszélyességi fokozatba (Biosafety level = BSL) történő – nemzetközi konszenzus alapján (pl. CDC/NIH NIAD, WHO, Ausztál/Új Zéland standard) kialakított -besorolásának listáját. A kórokozók veszélyességi szintjei nem tekinthetők egyedülként meghatározó tényezőnek a biológiai veszély megítélésében. Minden esetben figyelembe kell venni azt a laboratóriumi tevékenységet, amely keretében az adott kórokozóval dolgozik a laboratórium személyzete. Javasolt, hogy minden egyes „új” kórokozó esetében a laboratórium előzetes mikrobiológiai kockázatbecslést végezzen. Az aeroszol képződéssel járó munkafolyamatokat lehetőség szerint valamennyi kórokozó, de legalább az ún. bioterror ágensek esetében, biztonsági fülkében kell végezni. A 2001-es *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) spórával fertőzött levelek útján elkövetett bioterror cselekményt követően a CDC a bioterror cselekményben potenciálisan alkalmazható mikroorganizmusokat (elsősorban baktériumok) csoportosította (2). Bioterror ágenseknek azokat a természetes körülmények között is előforduló mikroorganizmusokat nevezik, amelyek terjesztése aeroszol útján könnyebben megvalósítható, stabilabbak, morbiditásuk és mortalitásuk magasabb, mint a klinikai laboratóriumban izolált tipikus baktériumoké. Ezen baktériumok gyakrabban okozhatnak laboratóriumi fertőzéseket is (pl. brucellózis, tularémia). A CDC definíciója szerint azok a kórokozók tekinthetők bioterror ágenseknek, melyek esetében felvetődik a nemzetbiztonsági kockázat veszélye. Az elsődlegesen e csoportba tartozó

kórokozókat a CDC csoportba (Cat. A-B-C) sorolta terjeszhetőségük, az általuk okozott megbetegedés morbiditása, mortalitása és a hatásukra kialakuló veszélyhelyzet kezelés minősége alapján. **A** csoportba sorolt: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), és a toxintermelő *Clostridium difficile*. **B** csoportba sorolt: *Brucella* spp., *Burkholderia mallei* (*B. mallei*), *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*).

A biológiai veszélyt jelentő minták és kórokozók kezelésére vonatkozó alapszabályok

A potenciálisan veszélyes kórokozók okozta „természetes” vagy szándékos cselekmény következtében kialakuló helyzet kezelésekor kiemelt jelentőségű a személyi és laboratóriumi biztonság szempontjainak történő megfelelés

- a mintavétel és mintaszállítás,
- a laboratóriumi tevékenység,
- a betegellátás részterületeire vonatkozóan.

E folyamatok szorosan összefüggenek a minták, tenyészetek, adatok és kommunikációs csatornák védelmével, és az együttműködő partnerek közötti fizikai és dokumentáció szintű kapcsolati pontok közötti védett útvonalak biztosításával (biosecurity) (2, 3, 4).

Járványügyi adatok

Az EU és EEA/EFTA tagországok bejelentett adatai alapján összeállított 2010-es ECDC éves jelentés szerint (5) a *Brucella* spp., *F. tularensis*, *B. anthracis* és *Y. pestis* okozta konfirmált esetek száma jellemzően nem emelkedik, de egyes országok területén napjainkban is tapasztalható a fertőzések járványos előfordulása:

- brucellózis: Európában a konfirmált esetszám 954 (2006), 639 (2007) és 843 (2008) volt. A 2008-as emelkedett esetszám oka egy Görögországban zajló járvány. Hazánkban, 2007-ben egy behurcolt eset fordult elő;
- tularémia: Európában a konfirmált esetek száma 568-ról (2006) 858-ra emelkedett (2008). A legtöbb esetet Svédország, Finnország és Norvégia jelentette. A hazai esetek száma 139-ről (2006) 25-re csökkent (2008);
- anthrax: Európában a konfirmált esetek száma folyamatosan csökken: 16 (2006), 5 (2007). A 2008-as évben 1-1 eset Görögországban, Nagy

Britanniában és Bulgáriában fordult elő. Az adott időszakban hazai eset nem fordult elő;

- *Y. pestis* okozta fertőzés már hosszú idő óta nem fordult elő Európában, a fertőzés veszélye azonban a nemzetközi utazások és migráció miatt fennáll: a pestis még endémiás Afrikában, a volt Szovjet utódállamokban, Afrika egyes országaiban, az Amerikai kontinensen és Ázsiában. A WHO adata szerint évente mintegy 2500 eset fordul elő a Földön. A WHO 2006-ban, egy Kongóban zajló járványról adott jelentést. Algériában (Langhouat) 2008-ban zajlott bubó pestis járvány.
- Az ECDC jelentés nem tartalmaz adatokat a takonykór és melioidózis esetek előfordulására vonatkozóan.

A bakteriológiai laboratóriumok együttműködésén alapuló laboratóriumi diagnosztika

A BSL-3 veszélyességi kategóriába tartozó kórokozók kimutatására irányuló laboratóriumi vizsgálatok a beteg célzott kezelése, a laboratóriumi (illetve ápoló) személyzet biztonsága és a releváns járványügyi intézkedések meghozatala érdekében kiemelt jelentőségűek.

A diagnosztika területén működő laboratórium feladata, hogy amennyiben az epidemiológiai, és/vagy anamnesztikus, és/vagy laboratóriumi adatok alapján felvetődik a gyanú valamely fent nevezett baktérium előfordulására,

- gondoskodjon arról, hogy valamennyi további laboratóriumi tevékenységét megfelelően üzemelő lamináris fülkében végezzen;
- haladéktalanul, előzetes megbeszélést követően, továbbítsa a megfelelő mintákat, az OEK Bakteriológiai II osztályon működő Veszélyes bakteriális kórokozók azonosítását szolgáló Nemzeti Referencia Laboratóriumba.

Ennek megvalósítása, tekintettel a bakteriális kórokozók kimutatásának differenciál diagnosztikai nehézségeire, az esetek egy részében nehézséget jelenthet. Jelen összeállítás célja, hogy az alábbiakban közölt információk segítségével segítse e tevékenységet.

A tenyésztéshez birkavért tartalmazó véres agar (V) és csokoládé agar (Cs) illetve MacConkey (MAC) vagy Eozin-metilénkék agar (EM) szükséges.

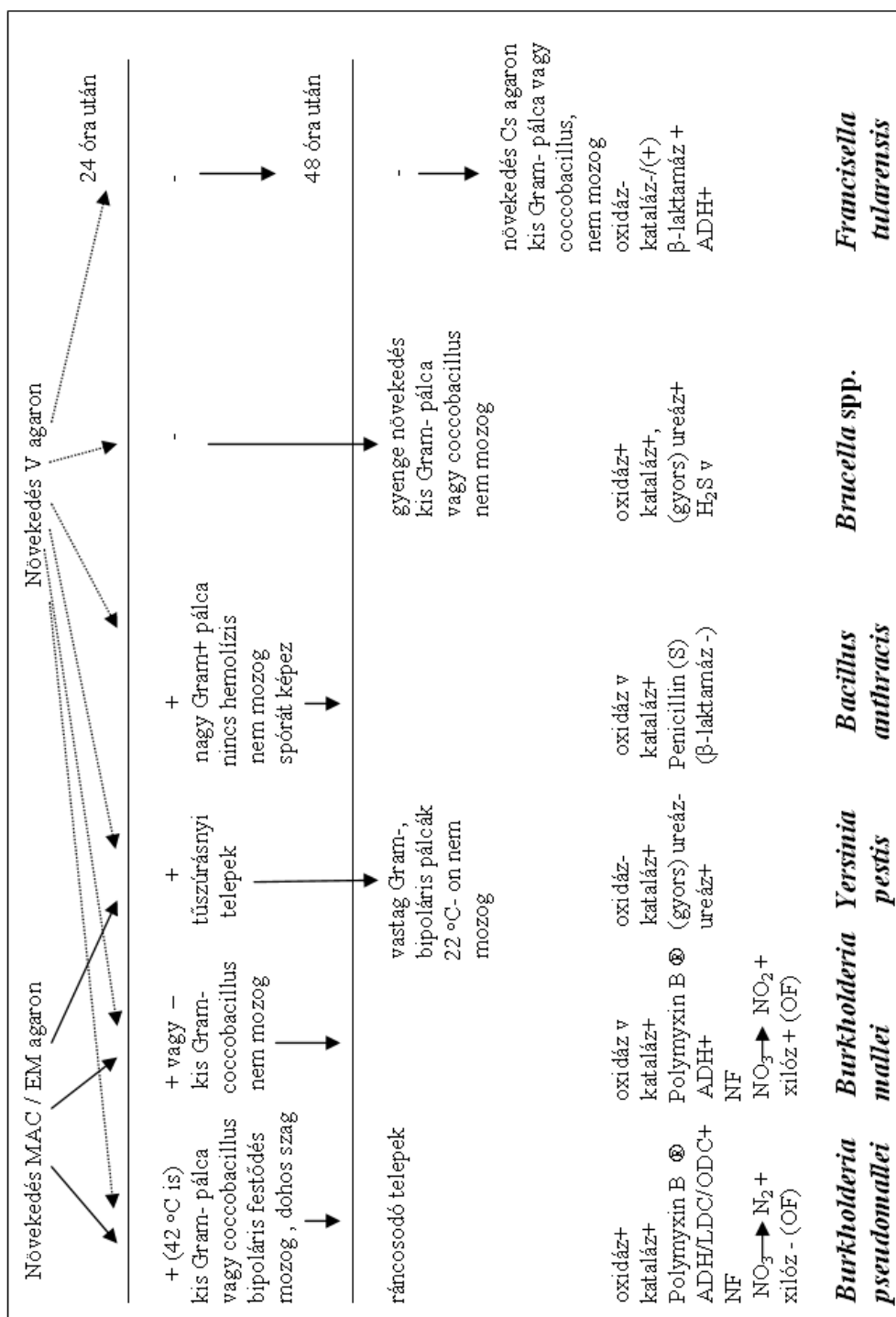
(Egyéb szelektív agar táptalajok használatára vonatkozó adatok az alábbiakban részletezett baktériumoknál találhatóak meg.)

1.táblázat: A hagyományos módon tenyésztető BSL-3 baktériumok legfontosabb fenotípusos tulajdonságai

	<i>B. anthracis</i>	<i>Brucella</i> spp.	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>F. tularensis</i>	<i>Y. pestis</i>
Gram-festés	+	-	-	-	-	-
Alak	Pálca	CB	Pálca (bipoláris)	CB	CB (pleomorf)	Pálca (bipoláris)
Mozgás	-	-	+	-	-	-
Hemolízis	-	-	-	NA	-	-
Kataláz	+	+	+	+	(+)/-	+
Oxidáz	V	+ ¹	+	V	-	-
Ureáz	-	+ ²	V	V	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
NO ₃ →NO ₂	+	+	+	+	-	+
NO ₃ →N ₂	NA	-	+	-	NA	NA
β-laktamáz	-	NA	NA	NA	+	NA
Polymyxin-B	R	NA	R	R	NA	NA
Arginin-dihidroláz	-	NA	+	+	+	NA
Növekedés 42 °C-on	NA	NA	+	-	NA	NA
Russel	NA	K/K	A/-	-	NA	A ^w /-
H ₂ S	-	V	-	-	-	-

CB = coccobacillus, ¹*B. canis* lehet negatív (28%), ²*B. canis* és *B. suis* ~15 perc, *B. abortus* és *B. melitensis* ~24h, A^w = savképzés (gyenge), K = lúgos színváltozás, NF = nem fermentáló, NA = nincs adat a hiányos és ellentmondó adatok miatt (6.-12. irodalom alapján)

1. ábra: Algoritmus a tenyésztendő BSL-3 baktériumok előzetes azonosításához



Rövidítések: MAC / EM = MacConkey agar / Eozin-metilénkék agar, V = Birkavéres agar, Cs = Csokoládé agar, + = pozitív

(+) = gyenge pozitív, - = negatív, v = változó, ® = rezisztens, S = érzékeny, ADH= arginin-dihidroláz, LDC= lizin-dekarboxiláz,

ODC=ornitin-dihidroláz, NF = nem fermentál (6-12 irodalom alapján)

A mikroszkópos vizsgálatok és néhány egyszerű teszt (Gram-festés, mozgásképeség, kataláz, oxidáz, ureáz, hemolízis, béta-laktamáz) kivitelezése a diagnosztikus vizsgálatot végző, orvosi mikrobiológiai laboratóriumokban (M1 és M2 kompetenciaszint) is megoldható (1. táblázat és 1. ábra).

Bacillus anthracis izolálásának valószínűségére utal, ha 15-24 óra elteltével a V agaron 2-5 mm-es, nem hemolizáló telepeket észlelünk és a Gram festett preparátumban nagy (1-1.5 – 3-5 μm), Gram-pozitív pálcák láthatóak (72 órás tenyészet Gram-variabilis lehet és ugyancsak öreg tenyészetekben a telepek alatt hemolízist észlelhetünk). A sejtek vége inkább szögletes, mint lekerekített, bizonyos körülmények között tokképzés tapasztalható. A spóráképződés közönséges körülmények között is lezajlik, az ovális spórák terminális vagy subterminális elhelyezkedésűek és a sejtek átmérőjét nem növelik meg. A sejtek nem rendelkeznek mozgásképeséssel. A pozitív kataláz teszt és a penicillin-érzékenység a *Bacillus anthracis* további jellemző tulajdonságai. Egyes *B. cereus* és *B. megaterium* törzsek – hasonlóan a *B. anthracis*-hoz -, nem rendelkeznek mozgásképeséssel, és ezen kívül nem hemolizálók is lehetnek. Szelektív táptalajokon (pl. MYP agar) a *B. anthracis* makroszkópos megjelenése hasonló lehet a *B. thuringiensis*-hez.

Burkholderia pseudomallei vagy *B. mallei* kitenyésztésének gyanúja vetődhet fel, ha a közönséges táptalajokon illetve MacConkey vagy EM agaron növekedő Gram-negatív, bipoláris festődésű pálcák oxidáz- és arginin-pozitívak. Gyakorlatilag ezeken kívül nincs egyetlen olyan nem pigmentált Gram-negatív pálca sem, amely arginin-pozitív, glükózt nem fermentál és polymyxin B-vel szemben rezisztens lenne. Egymás között a két fajt a mozgás képessége és a NO_3 -ból N_2 gázig történő reakció jól elkülöníti; a *B. pseudomallei* NO_3 -ból N_2 gázt képez és mozgásképeséssel rendelkezik. A *B. pseudomallei* azonosítására a festékeket (kristályibolya és neutrálvörös) és gentamicint tartalmazó Ashdown agaron történő jellegzetes (a jól növekedő, lila színű telepek gyűrt felszínűek) növekedés kimutatása is célra vezető lehet. Az ezen a táptalajon hasonló növekedést mutató *B. thailandensis*-től az arabinóz értékesítés különíti el a *B. pseudomallei*-t, amennyiben az utóbbi arabinózt nem asszimilál.

Brucella spp. baktériumok gyanúja vetődik fel, amennyiben egy V agaron növekedő, pigmentációt nem mutató baktérium a MacConkey vagy EM agaron nem növekedik, a Gram-festett kenetben apró, Gram-negatív pálcikák látszanak, továbbá a kataláz és oxidáz teszt egyaránt pozitív eredményt ad. Ilyenkor a további, megerősítő vizsgálatokat a legnagyobb biztonság mellett kell kivitelezni (pl. a kataláz teszt kivitelezése fertőzési veszélyt jelenthet az aeroszol képződése miatt). Ha az ureáz teszt pozitív és az izolátum steril helyről vett

mintából tenyésztett ki, valószínű lehet *Brucella* spp. jelenléte. Mindazonáltal a brucellák és egyéb ureáz-pozitív baktériumok (*Bordetella bronchiseptica*, *Ochrobactrum anthropi*, *Oligella ureolytica*, *Psychrobacter phenylpyruvicus*) differenciál diagnózisa nehézséget okozhat. Elkülönítésük más ureáz és oxidáz pozitív, Gram-negatív coccobacillusoktól a fenilalanin-deamináz teszttel lehetséges: a brucellák esetén ez mindig negatív, az *Oligella ureolytica* és *Psychrobacter phenylpyruvicus* esetében pozitív. Az *Ochrobactrum anthropi* és *Bordetella bronchiseptica* baktériumok elkülönítésére alkalmas további fenotípusos tulajdonság a növekedési képességük MacConkey agaron.

Francisella spp. baktérium gyanú felvetődik, ha a mintából ciszteint is tartalmazó Cs agaron növekedő, de V, MacConkey vagy EM agaron nem növekedő baktériumok kerülnek kitenyésztésre. A gyengén festődő, vékony, Gram-negatív pálcák vagy coccobacillusok pleomorfak. Az oxidáz reakció eredménye negatív, a kataláz teszt gyengén pozitív vagy negatív. Ha a Gram festődés nem tipikus, a Cs agaron ugyancsak növekedő és mikro morfológiai szempontból hasonló *Haemophilus* sp. baktériumoktól XV faktor igény, oxidáz teszt és sejt morfológiai tulajdonságok alapján lehet őket megkülönböztetni: utóbbiaknak növekedési faktor igénye van, általában oxidáz-pozitívak, sejtjeik nagyobb méretűek és inkább pálcá alakúak. A *Francisella* spp. baktériumok béta-laktamáz termelők, az *Actinobacillus* fajoktól ez alapján jól elkülöníthetőek.

A *Yersinia pestis* a legtöbb tápanyagban gazdag laboratóriumi táptalajon jól, de lassan növekedik, optimális növekedési tartománya 22 - 28 °C. Bár 24 óra után, V agaron, túszerű telepei már láthatóak - mivel laktózt nem fermentál -, MacConkey vagy EM agaron ilyen idős tenyészetekben telepeket nem mindig találunk. A Gram-negatív, pleomorf, bipoláris pálcák, más *Yersinia* fajoktól vagy egyéb Gram-negatív pálcáktól nem megkülönböztethetőek. A jellegzetes bipolaritás kimutatására egyéb festési eljárások alkalmazása javasolt (pl. Wayson vagy Wright módszer). Nem rázatott leves tenyészetben „sztalaktit”-szerű (a cső falán lecsüngő cseppkőszerű) megjelenési forma látható. (Hasonló növekedési formát a *Streptococcus pneumoniae* vagy a *Yersinia pseudotuberculosis* is mutathat.) A *Yersinia* genus egyetlen nem mozgó faja. Oxidáz-negatív és kataláz-pozitív.

A hagyományos automata berendezések adatbázisa ezeket a baktériumokat vagy nem tartalmazza vagy csak a típusos izolátumok adatai alapján készült, így az ezekkel végzett vizsgálatok eredménye gyakran vezethet

helytelen diagnózishoz. (Az ilyen berendezésekkel végzett vizsgálatok aeroszol képződésével járó előkészítő munkálatait - pl. szuszpenzió készítése - mindenképpen biztonságos körülmények között szükséges elvégezni.) Az irodalom szerint pl. az API 20 NE (Biomérieux) tesztsíkkal a *Brucella* izolátumokat tévesen *Psychrobacter* (*Moraxella*) *phenylpyruvica*-ként, a *Burkholderia pseudomallei*-t pedig gyakran *B. cepacia*-ként azonosították. A *Yersinia pestis* izolátumai gyakran kevésbé reaktívak, így a kereskedelemben kapható tesztekkel ezeket szintén nehéz adekvát módon azonosítani. Esetükben a téves eredmény *Y. pseudotuberculosis*, *Shigella* vagy H₂S-negatív *Salmonella* és *Acinetobacter* sp. lehet. A *Francisella tularensis* automatával történő téves azonosítása szintén gyakori, pl. a VITEK NHI panel magas, 99 %-os biztonsággal azonosíthatja *Actinobacillus actinomycescomitans*-ként ezt a kórokozót.

Bármelyik BSL-3 veszélyességi szintű baktérium fokozott veszélyt jelent a laboratórium személyzetére, így a fentiek alapján a biztonságos munkavégzésre alkalmas lamináris fülke használata indokolt az alábbi esetekben:

- Nem hemolizáló, nagy, Gram-pozitív, spóraképző pálcákkal rendelkező baktérium kitenyésztése.
- Polymyxin B-vel szemben rezisztens, oxidáz pozitív, kellemetlen szagú (intenzív és szokatlan, egyes leírások szerint rothadás-szerű) baktérium izolálása.
- Oxidáz- és kataláz-pozitív, MacConkey vagy EM agaron nem növekedő, ureáz-pozitív baktérium kitenyésztése.
- V vagy Cs agaron 24 óra után nem, de több napos inkubációt követően növekedő baktérium kitenyésztése.
- Nyirokcsomókból vagy hemokultúrából származó, hagyományos automata identifikáló rendszerben kevésbé reaktív Gram-negatív pálca kitenyésztése.

Az orvosi mikrobiológiai laboratóriumokban alkalmazott közönséges táptalajokon kitenyészthető BSL-3 kategóriájú baktériumok legfontosabb tulajdonságaira épülő algoritmus (1. ábra) segíti a gyanú felvetődését. Ha az alapvető megfigyelések alapján az izolátum BSL-3 veszélyességi kategóriába tartozó baktériumnak látszik, nem szabad automata identifikáló berendezést

vagy egyéb, kereskedelmi forgalomban kapható kitted alkalmazni. Az adott kórokozó kizárását a bemutatott algoritmus, illetve az 1. táblázatban megadott tulajdonságok alapján, hagyományos módszerekkel ajánlott elvégezni.

A veszélyes kórokozók diagnosztikájában kiemelt szerep jut a molekuláris identifikálásnak (referencia laboratóriumi feladat). Az általuk okozott fertőzések gyorsan terjedhetnek. A molekuláris technika előnye a hagyományos identifikálás időigényes eljárásával szemben a gyors eredmény és a nagyfokú érzékenység. A kórokozó azonosítása és patogén markereinek meghatározása real-time PCR és/vagy hagyományos PCR technika alkalmazásával történhet. Az eredmény verifikálása és a végső eredmény kiadása azonban kizárólag a hagyományos és molekuláris vizsgálatok eredményének együttes értékelésével lehetséges. A BSL-3 szintű kórokozókból történő PCR vizsgálatok történhetnek az adott baktérium tenyészetéből, környezeti- és ételmintából vagy közvetlenül a klinikai mintából (genny, szövet, hámkaparek stb.) is. Klinikai minták esetén a levett mintát hűtve kell tárolni a laboratóriumba érkezésig. A minták feldolgozása BSL-3 laboratóriumi körülményeket igényel.

Bacillus anthracis esetén két plazmid (pX01 és pX02) hordozza a virulenciáért felelős géneket (*pagA* és *capB*), melyek kódolják a teljes patogénitáshoz szükséges fehérjéket. A gének kópiaszáma határozza meg a virulencia mértékét. Az egyik vagy mindkét plazmid hiányában vakcina törzzsel van dolgunk. A *B. anthracis* baktériumot a *B. cereus*-tól és *B. thuringiensis*-től a kromoszómáisan kódolt RNS polimeráz B-t kódoló *rpoB* gén jelenléte különbözteti meg. Mivel leírtak már olyan súlyos, inhalációs anthrax-szerű megbetegedéssel járó esetet, amikor a *pagA* homológ gén *B. cereus* baktériumban volt jelen, ezért az említett három gén együttes vizsgálata indokolt (14).

Burkholderia mallei és *B. pseudomallei* kórokozók azonosításakor a két faj egymástól illetve *B. thailandensis*-től való elkülönítésén van a hangsúly. A három faj elkülönítése a toxin sejtbe juttatásáért felelős, 3-as típusú szekréciós rendszer (TTS) altípusait, a TTS1 és TTS2-t kódoló gének jelenlétének kimutatásán alapul (15).

Brucella fertőzés gyanú esetében elsődleges feladat a *B. abortus* és *B. melitensis* kimutatása és elkülönítése. Mivel az egyes brucella fajok genetikailag igen hasonlítanak egymáshoz, egymástól való elkülönítésük nagy kihívás jelent.

Multiplex PCR-rel, egy lépésben van lehetőség a *B. suis*, *B. abortus* és *B. melitensis* fajok elkülönítésére (16).

Francisella tularensis fertőzésénél a baktérium kimutatása az elsődleges szempont. Alfajainak elkülönítése real-time PCR MLVA kombinációjával lehetséges, mely hasznos információt szolgáltat az adott fertőzés lehetséges származási eredetéről is.

Yersinia pestis baktérium okozta fertőzésnél figyelembe kell venni a *Y. pseudotuberculosis*-tól való elkülönítést.

Vakcináció csak *B. anthracis* ellen létezik. A BSL-3 szintű kórokozók viszonylagosan alacsony elterjedésüknek köszönhetően igen jól reagálnak az antibiotikus terápiára. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat referencia laboratóriumban végzendő feladat.

A *B. anthracis* törzsek rendszerint penicillin érzékenyek. Postexpoziációs eljárásként vakcináció és 60 napon át szedett antimikrobiális terápia (Ciprofloxacin vagy Doxycyclin) elfogadott a nemzetközi gyakorlatban (17).

Yersinia pestis mindkét formájánál (bubó pestis és tüdőpestis) Gentamicin vagy Streptomycin az először választandó szer (10 nap), posztexpoziációs profilaxis: 7 napon át szedett Ciprofloxacin vagy Chloramphenicol.

A tularémia megbetegedés Gentamicinnel és Streptomycinnel kezelhető, postexpoziációs esetén a pestishez hasonlóan Ciprofloxacin vagy Chloramphenicol javasolt, 14 napon át.

Akut brucellózis Doxycyclinnel és Rifampicinnal kezelendő 6 héten át.

Burkholderia fertőzés esetén Imipenem vagy Meropenem adása ajánlott 6 héten át, profilaktikusan 3-6 héten keresztül (18) Körkísérletek során szerzett tapasztalataink alátámasztják a nemzetközi előírásoknak megfelelő antibiotikum érzékenységet (19).

Irodalom

1. 61/1999. (XII. 1.) EüM rendelet: a biológiai tényezők hatásának kitett munkavállalók egészségének védelméről.
net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=99900061.EUM
2. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories CDC, 5th Edition, 2009
3. <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL.pdf>
4. World Health Organization: Guidance on regulations for the Transport of
5. Infectious Substances 2007-2008
6. www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EP_R_2007_2/en/index.html
7. UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods. Model regulations (15th. Edition), New York, Geneva: United Nations, 2007, ST/SG/AC.10/1/Rev.15, ISBN 978-92-1-139120-6
8. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010, ECDC
9. Anthrax: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis. Last updated July 28, 2010
<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/anthrax/biofacts/anthraxfactsheet.html>
10. P. Bossi, A. Tegnell, A Baka, F van Loock, J Hendricks, A Werner, H Maidhof, G Gouvras: BICHAT guidelines for the clinical management of anthrax and bioterrorism-related anthrax Eurosurveillance, 9, 12, 2004
11. Plague: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis. Last updated April 29, 2010
12. <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/plague/biofacts/plaguefactsheet.html>
13. Tularemia: Current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis, treatment, and prophylaxis. Last updated March 16, 2010
14. <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/bt/tularemia/biofacts/tularemiafactsheet.html>

15. Mantur, B.G., Amarnath, S.K., Shinde, R.S.: Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. IJMM 25(3): 188-202 (2007)
16. Gilad, J., Harary, I., Dushnitsky, T. et al.: Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. IMAJ 9: 499-503 (2007)
17. Wagar, E.A., Mitchell, M.J., Carroll, K.C. et al.: A review of sentinel laboratory performance. Identification and notification of bioterrorism agents. Arch Pathol Lab Med 134: 1490-1503 (2010)
18. York, M.: Sentinel bioterrorism responders: are hospital labs ready? MLO Med Lab Obs 35(8): 12-7 (2003)
19. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, et al. Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci 2004 Jun 1;101(22):8449-54
20. Thibault FM, Valade E, Vidal DR. Identification and discrimination of Burkholderia pseudomallei, B. mallei, and B. thailandensis by real-time PCR targeting type III secretion system genes. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5871-4.
21. Kumar S, Tuteja U, Sarika K, Singh D, Kumar A, Kumar O. Rapid Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection of the Brucella Genus, B. abortus, B. melitensis, and B. suis Microbiol. Biotechnol. 2011 ; 21(1): 89~92
22. EMEA/CPMP Guidance document on use of medicinal products for treatment and prophylaxis of biological agents that might be used as weapons of bioterrorism, London, 25 July 2002
23. CIDRAP www.cidrap.umn.edu
24. CDC, 2009 www.bt.cdc.gov

Elérhetőségeink:

Országos Epidemiológiai Központ
1097 Budapest, Gyáli út 2.-6.

Bakteriológiai II. osztály (C épület, I emelet), VNRL laboratórium
Kontakt személyek: Dr Herpay Mária, Dr Szabó Zsuzsanna, Pályi Bernadett
Telefon/FAX: 06-1-476-1391

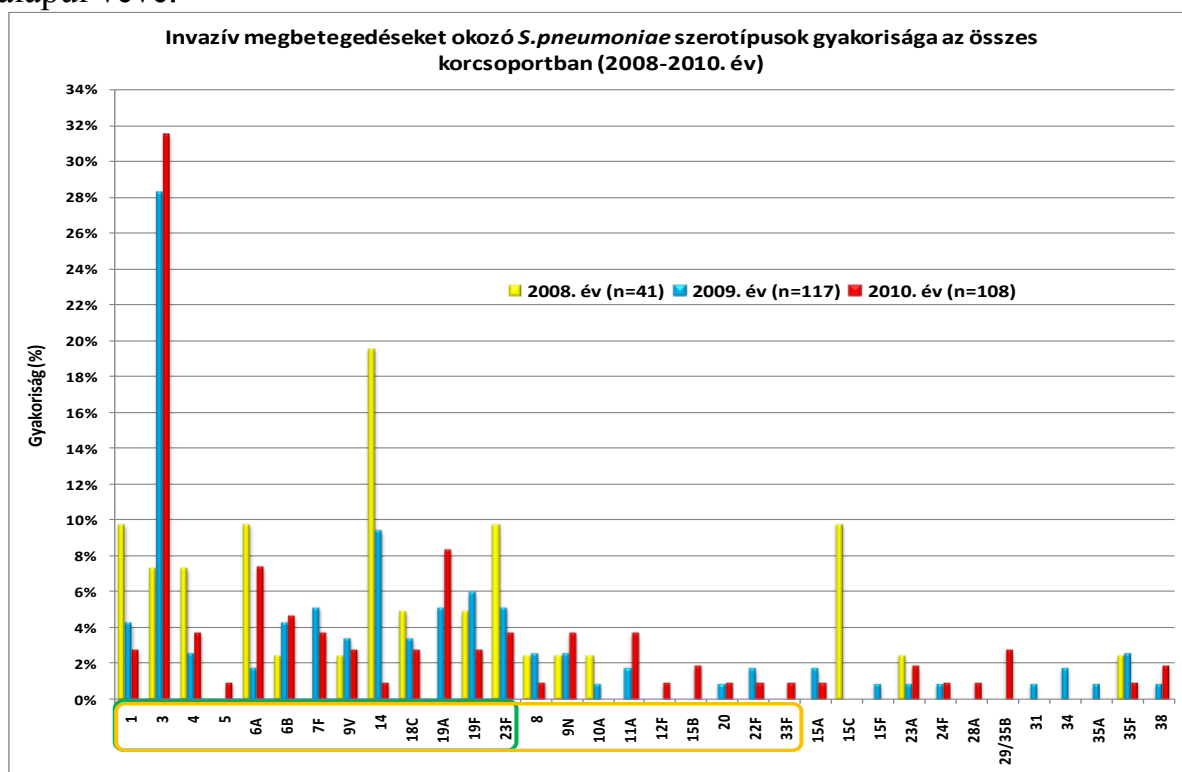
Invazív megbetegedéseket okozó *Streptococcus pneumoniae* szerotípusok 2008-2010 között.

(Az Országos Epidemiológiai Központba beküldött törzsek szerotipizálási adatai alapján)
Tirczka Tamás, Berta Brigitta

A 2008 októberében elindult vizsgálatsorozat, az invazív fertőzésekből származó *S. pneumoniae* szerotípusainak meghatározását tűzte ki célul. A pneumococcus elleni PCV7 konjugált vakcina Magyarországon 2005 decemberében került forgalomba. Az utóbbi két évben megjelent új konjugált vakcinák is, a PCV10 és a PCV13, aktív immunizálásra szolgálnak, a *S. pneumoniae* által okozott invazív megbetegedések, a pneumonia és az akut otitis media megelőzésére 6 hetestől 5 éves korig.

Az idősebb korosztály rendelkezésére álló 23 szerotípust tartalmazó poliszacharid vakcina, olyan 2 éves vagy annál idősebb egyének számára ajánlott, akiknél fokozott a pneumococcus okozta megbetegedés vagy haláleset kockázata. A vakcina nem hatásos az akut középfülgyulladás, arcüreggyulladás és más közönséges felső légúti fertőzések esetén.

Természetes folyamat, hogy a hatékony védőoltások következtében az oltóanyagok által tartalmazott szerotípusok relatív gyakorisága csökken, még az egyéb, ún. *nem-vakcina* szerotípusok aránya növekszik. Tekintsük át a jelenlegi állapotot a szerotípusok megoszlásának tekintetében, az összes korcsoportot alapul véve.



1.ábra

(Megjegyzés: A statisztikai feldolgozás során személyenként csak egy mintát vettünk figyelembe, kivéve, ha a mintavételek között több mint egy hónap telt el.)

Az adott időszakban szerotipizált 266 invazív pneumococcus törzs 34-féle szerotípusba volt besorolható. Az eredmények alapján a leggyakrabban előforduló szerocsoport a **3-as** (26,3%) volt, melyet lényegesen alacsonyabb gyakorisággal a **14-es** szerotípus követett (7,5%). Gyakoribb szerotípusok voltak még a **19A** (5,6%), a **23F**, a **6A** (5,3%-5,3%), az **1** és **19F** (egyaránt 4,5%-4,5%). Jobban követhetők a szerotípusok gyakoriságában bekövetkezett változások, ha évenkénti bontásban tekintjük át őket. (**1. ábra**).

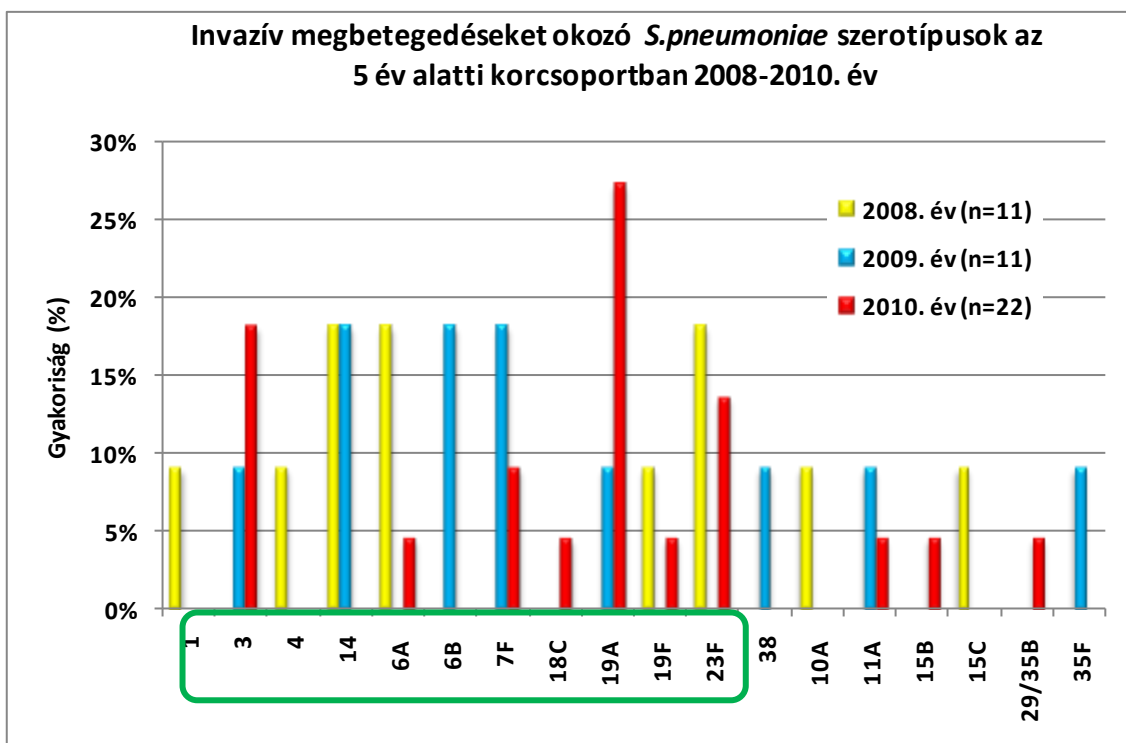
(A kezdeti 2008 évi adatokat még csak tájékoztató jellegűnek tekinthetjük, hiszen az alacsony mintaszám statisztikailag nem reprezentatív). A legjelentősebb változás a 14-es szerotípust érintette. A vizsgált időszakban a kezdeti 20%-ról gyakorisága 1%-ra csökkent. Ezzel szemben a 3-as szerotípus gyakorisága 7%-ról 2010-ben 30% fölé emelkedett. Figyelemfelkeltő a 19A (8,3%) és 6A (7,4%) szerotípusok növekedése, melyek a gyakoriságuk alapján 2010-ben a második illetve harmadik helyen álltak. Számos, a PCV7 bevezetését követő szerotípus változásokkal foglalkozó irodalomban találunk utalást arra vonatkozóan, hogy az invazív pneumococcus fertőzésekben az ún. *non-vaccine* szerotípusok gyakorisága megnövekedett, így a 19A-é is. Ennek a jelentőségét fokozza az a tény, hogy az ebbe a szerotípusba tartozó törzsek nagy része multidrog rezisztens.

Az összes korcsoportot figyelembe véve a 13-valens vakcina szerotípusai közé az izolátumok 77,4%-a (206 db), a 23-as vakcina szerotípusai közé 88,7% (236 db) tartozott, míg 11,3%-uk (30 db) a nem- vakcina szerotípusok közé volt sorolható. (Az ábrán a 13-as és 23-as vakcinák által tartalmazott szerotípusokat színes kerettel jelöltük).

A konjugált vakcinák az 5 évnél fiatalabb gyermekek pneumococcus elleni immunizálására javasoltak. Indokolt tehát ebben a korcsoportban követni a változásokat. A vizsgált időszak alatt mindössze 44 törzs szerotípusa került meghatározásra. Lényegesen kevesebb törzset küldtek be a laboratóriumok ebben az időszakban, mint 2002-2004 között (69 db). Az előbb említett korábbi időszakban sorrendben a 14, 6B, 3 és 19A szerotípusok voltak a leggyakoribbak az 5 év alatti korosztályban. 2008-2010 évben némileg változott a helyzet és a 19A vált a leggyakoribb szerotípussá. Sorrendben a 3 és 23F majd a 14 és 7F követi. A kis számok miatt a százalékos gyakoriság félrevezethető lehet, hiszen már egy-egy törzs jelenléte is jelentős százalékos eltérést eredményezhet. Ezért az adatokból messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le.

A **2. ábrán** jól látható, hogy a 19A mellett a 3 és 23F szerotípusok száma emelkedett 2010-ben a 2009 adatokhoz képest. Egyes szerotípusok, mint pl. a 14, 6B nem fordultak elő a 2010. évben. A 2008-2010 év szerotípusai közül

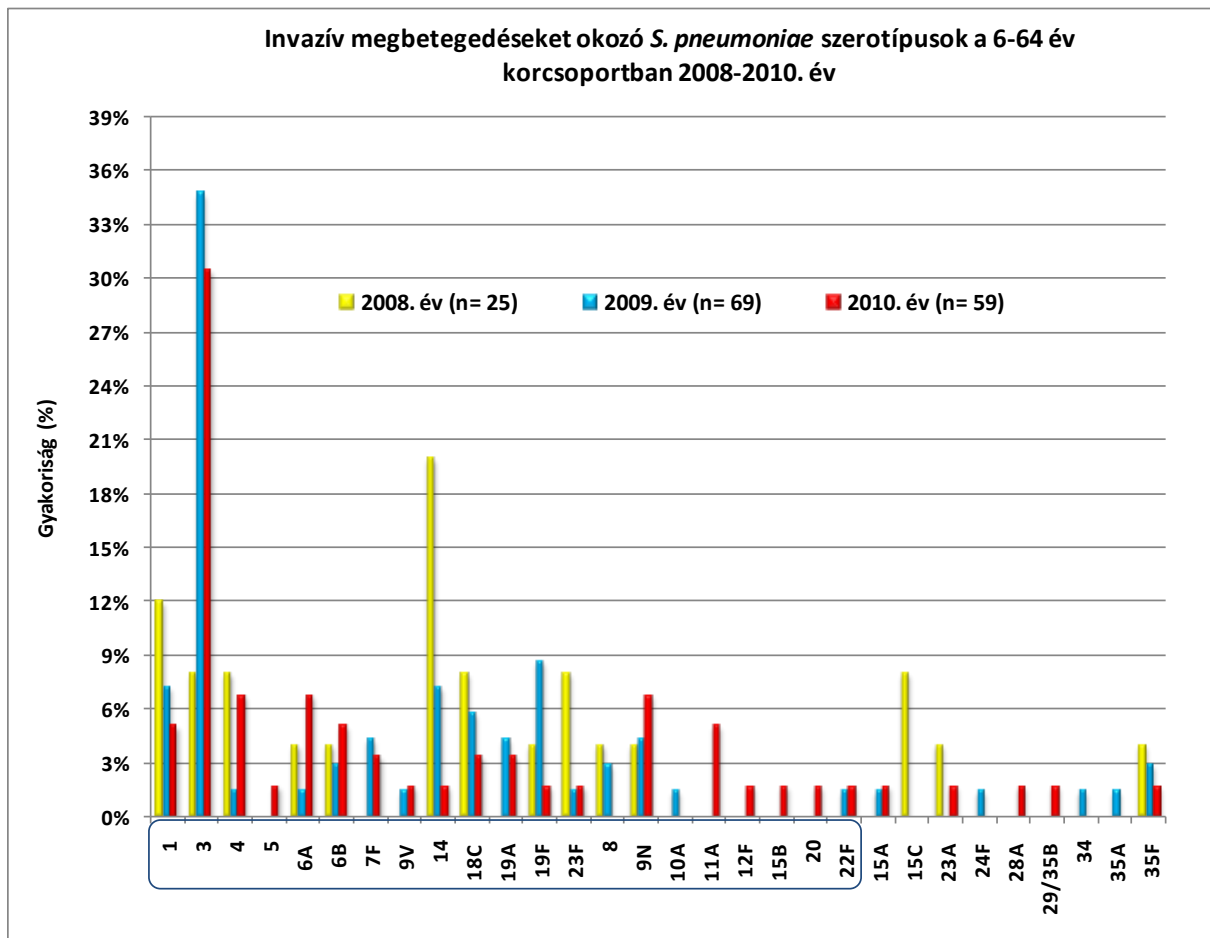
34% volt azonos a PCV-7 vakcina szerotípusaival, szemben a 2002-2004. év 59,4%-ával. Ugyanakkor a PCV-13 által lefedett szerotípusok aránya a 2002-2004 évi 91,3%-ról 79,5%-ra csökkent.



2. ábra

Mint azt a bevezetőben említettük az 5 évnél idősebb korosztály számára a 23-valens polyszacharid oltóanyag nyújthat védelmet a pneumococcus infekciók ellen.

A 6-64 év közötti korcsoportban (153 törzs, 30 –féle szerotípus) a 23-valens vakcina a szerotípusok 90,2%-át fedi le. (3.ábra)

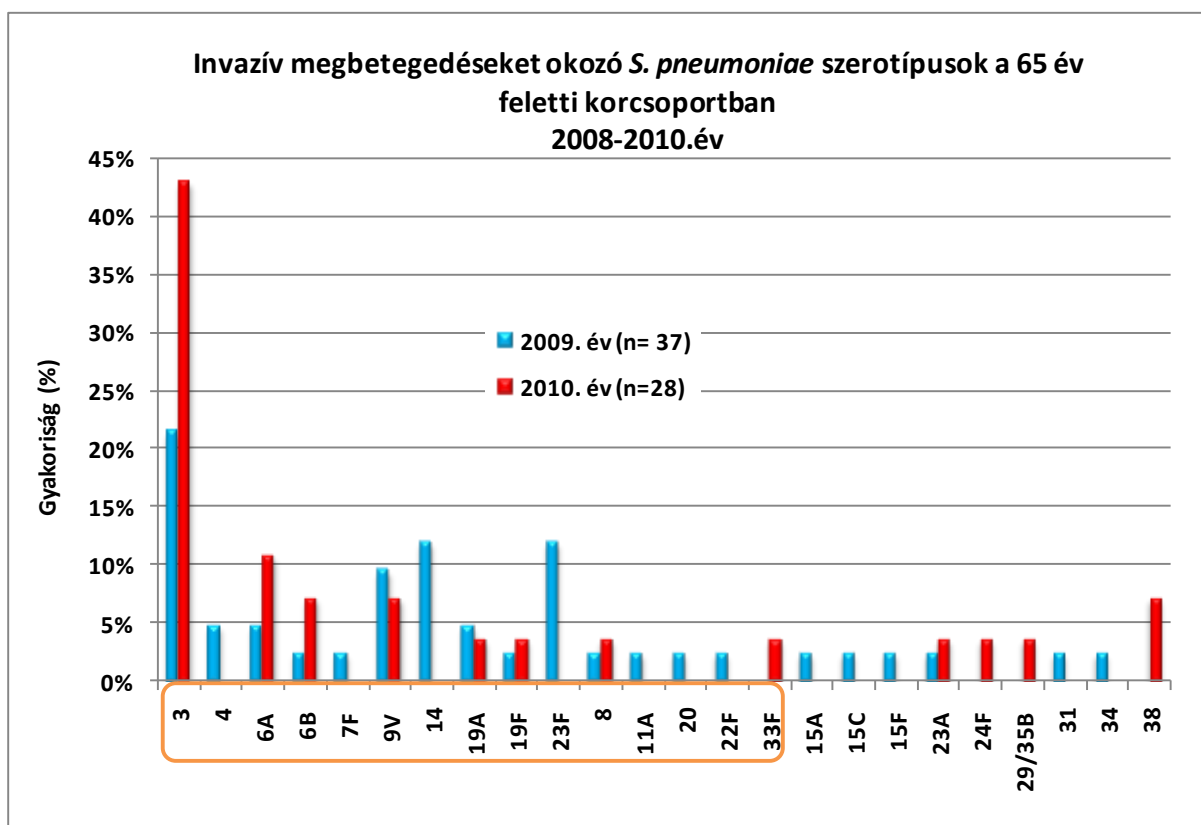


3.ábra

A 2008 évi szerotípus gyakoriság egyes szerotípusok esetében szembetűnő változáson ment keresztül 2010-ig. A 2008. évben vezető szerepet betöltő 14-es szerotípus (20%) 2010-re mindössze 1,7% -ra csökkent. A 3-as ellenben a kezdeti 8%-ról indulva 2009-ben és 2010-ben is gyakoriságban meghaladta a 30%-ot. Megjelentek újabb szerotípusok, mint pl. a 11A, 12F, 15B, 20, 28 és a 29/35B.

A pneumococcus surveillance alapján az tapasztalható, hogy egyre inkább növekszik az idősebb, 60 (65 év feletti) korosztályból izolált és beküldött törzsek száma, ugyanakkor az 5 éven aluliak korcsoportjából csökkent.

Emelkedett a gyakorisága a 3, 6A, 6B és a 38 szerotípusoknak. A 14 és 23F szerotípusba, melyek még 2009-ben 12%-ban fordultak elő, 2010-ben már egyetlen törzs sem tartozott. Ebben a korcsoportban a polyszacharid oltóanyag a szerotípusok 82,3%-át fedte le. (4.ábra)



4.ábra

Néhány szót kell ejteni a középfül váladékokból izolált *S. pneumoniae* szerotípusokkal kapcsolatban is. Mint az ismert a középfülgyulladás elsősorban gyermekbetegség, leggyakrabban az 5 év alatti korosztályt érinti. A belőle esetleg kialakuló meningitis megelőzhető a konjugált vakcinákkal, ezért fontos ismerni azokat a szerotípusokat, amelyek szerepet játszhatnak ebben a folyamatban. A 2008-2010. években szerotipizált 78 törzs 21-féle szerotípusba volt besorolható. A 2 év alatti korosztályban (n=32) a leggyakoribbnak a 19F bizonyult (22%, n=7), ezt 9 % körüli értékkel (n=3-3) a 3, 6B, 7F és a 19A szerotípusok követték. A 2 év feletti korcsoportokban (n=46) egyértelműen a 3 szerotípus a meghatározó (48%, n=22). Gyakoriak még a 19F (n=4) és a 7F (n=3). Az oltóanyag általi szerotípus lefedettség PCV- 7 esetében: 36%, a PCV-13 esetében: 83%.

Irodalom:

1. S.Maraki, G. Samonis, E. Galanakis: Serotypes and susceptibilities of paediatric clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Crete, Greece, before and after the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine, *Eur J. Clin.Microbio.Infect. Dis.* (2010) 29:1449-1451
2. Yu-Chia Hsieh, We-Sen Lee, Pei-Lan Shao, Luan-Yin Chang, Li-Min Huang: The Transforming *Streptococcus pneumoniae* in the 21st Century; *Chang Gung Med J* Vol. 31 No.2 (2008 March-April)
3. Rodenburg GD, de Greeff SC, Jansen AG, de Melker HE, Schouls LM, Hak E, Spanjaard L, Sanders EA, van der Ende A.: Effects of pneumococcal conjugate vaccine 2 years after its introduction, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2010 May;16(5):816-23.
4. Sheldon L. Kaplan, William J. Barson, Philana L. Lin, Stephanie H. Stovall, John S. Bradley, Tina Q. Tan, Jill A. Hoffman, Laurence B. Givner, Edward O. Mason.: Serotype 19A Is the Most Common Serotype Causing Invasive Pneumococcal Infections in Children; *PEDIATRICS* Vol. 125 No. 3 March 2010, pp. 429-436
5. Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL.: Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine.* 2010 Jun 11;28(26):4249-59.
6. Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR.: Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis.* 2010 Mar;14(3):e197-209.
7. Hyunju Lee, Moon H. Nahm, Robert Burton, and Kyung-Hyo Kim: Immune Response in Infants to the Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine against Vaccine-Related Serotypes 6A and 19A; *Clinical and Vaccine Immunology*, March 2009, p. 376-381, Vol. 16, No. 3

Ezúton köszönjük minden eddigi és ezután együttműködő laboratóriumnak a törzsek beküldésével való hozzájárulását a pneumococcus surveillance munkájához.

Továbbra is várjuk az invazív fertőzésekből, valamint a középfül váladékokból izolált *S. pneumoniae* izolátumokat, melyek vizsgálata a beküldő laboratóriumok számára továbbra is térítésmentes.

A pertussis atípusos megjelenésű formája, és a laboratóriumi diagnosztika fontossága

Irodalmi összefoglaló

Ferenczné Paluska Ildikó

A védőoltással megelőzhető fertőzőbetegségek közül, egyedül a pertussis az, amelynek előfordulása világszerte folyamatosan növekszik a nagymértékű átoltottsággal rendelkező országokban is.

Ennek egyik okát abban látják, hogy a védőoltást követően nem alakul ki életre szóló védettség, a másik szintén fontos tényező hogy a vakcina törzstől eltérő antigenitással rendelkező *Bordetella pertussis* törzsek jelentek meg.

A világ több pontján, a friss *B. pertussis* izolátumok molekuláris vizsgálata feltárta, hogy a védőoltás 1950-es években megkezdett alkalmazása óta egy „vakcina-driven” szelekciós folyamat eredményeként a vakcina törzstől eltérő alléltípusok jelentek meg több, az immunitás kialakítása szempontjából fontos antigén esetében. Kimutatták, hogy a védőoltás következtében a vakcina törzsszel szemben kialakult immunitás csökkent védelmet biztosít az újonnan megjelent allélok hordozó törzsekkel szemben.

A molekuláris vizsgálatok a védettség kialakulásában legfontosabb szerepet játszó antigénekre illetve az acelluláris vakcina komponenseiként alkalmazott antigénekre (pl. pertussis toxin subunit S1 és S3 pertactin, LPS, fimbrial antigén) terjedtek ki.

A pertussis toxin S1 alegység génjének a vizsgálata alapján 4 alléltípust tudtak azonosítani: PtxS1A, PtxS1B, PtxS1C, PtxS1D

A pertactin génjének 10 allélját azonosították: Prn1-9 és 11

A vakcina előállítására használt törzs, és a friss izolátumok összehasonlítása eredményeként minden esetben régi és új allélok lehetett megkülönböztetni. A régieket a 1970-es években izolálták, és a vakcina törzs is tartalmazza, míg az újak a 1980-as években jelentek meg és napjainkban főleg ezek terjedtek el a népességben.

A vakcinatörzs a „rég” típusú allélkombináció: Prn1, PtxS1B vagy PtxS1D.

A friss izolátumokra jellemző „új” típusú allélkombináció: Prn2 vagy Prn3, PtxS1A.

Vannak vegyes allélkombinációt tartalmazó törzsek is.

A szelekciót mind a celluláris, mind az acelluláris vakcinatípusok alkalmazása mellett megfigyelték.

A virulencia faktorok esetében Dániában mutattak ki először szekvencia polimorfizmust, majd Hollandiában, Finnországban, Angliában, Kanadában,

Olaszországban és az USA-ban mutattak ki allélvariációt a vakcina törzshöz képest.

Az a megoldás körvonalazódik a vizsgálatok alapján, hogy a booster oltások mellett hatékonyabb védőoltásra van szükség, amely új allélkombinációt tartalmazó törzs felhasználásával készül.

A pertussis esetek napi laboratóriumi diagnosztika szempontjából is kívánatos a kórokozó direkt kimutatása PCR-rel vagy tenyésztéssel.

A PCR-vizsgálat érzékenyebb, és a minta eljuttatása a vizsgáló laboratóriumba egyszerűbb, továbbá lehetőség van a *Bordetella* genus tagjainak megbízható elkülönítésére is. A *B. bronchiseptica* fertőzés human megbetegedésekben is előfordul, tehát a diagnosztikának erre a speciesre is ki kell terjednie.

A tenyésztésre a mintát a betegség első három hetében ajánlott levenni, mert később illetve az antibiotikum kezelés megkezdése után sikertelen lesz a kórokozó izolálása.

A hazai szeropozitív esetek száma is emelkedő tendenciát mutat. Ez arra utal, hogy a kórokozó is egyre nagyobb számban van jelen.

A szerológiai diagnosztika megerősítésére, ill. később hatékonyabb hazai védőoltás kidolgozása szempontjából is arra van szükség, hogy pertussis gyanúja esetén a betegtől a savóminta mellett a kórokozó kimutatására illetve izolálására alkalmas minta kerüljön az OEK laboratóriumába.

Irodalom:

1. Eurosurveillance, vol 12. Issue 9, 01. Sept. 2007, Pertussis: an old disease in new clothes
2. Eurosurveillance, Vol 8, Issue 27, 01 July 2004, Pertussis incidence in Netherlands after introduction of an acellular booster vaccination at 4 years of age
3. Eurosurveillance, Vol 12, Issue 9, 01 Sept. 2007, Pertussis : a cluster of linked cases in the United Kingdom, 2006
4. Eurosurveillance, Vol 12. Issue 1. , 01. Jan. 2007, Pertussis surveillance in french hospitals: results from a 10 year period
5. Eurosurveillance Vol. 12. Issue 9 , 01. Sept. 2007, Incidence trend in pertussis in the autonomous region of Madrid, Spain : 1982-2005
5. Eurosurveillance Rapid Communications 02. Sept. 2010.
6. J. Clin. Microbiol. Feb. 2000 p. 800-806., Specificity and Sensitivity of High Levels of Immunoglobulin G Antibodies against Pertussis Toxin in a Single Serum Sample for Diagnosis of Infection with *Bordetella pertussis*.
7. J. Clin. Microbiol. Jan. 2005. p.30-35. External Quality Assessment for Molecular Detection of *Bordetella pertussis* in European Laboratories
8. J. Clin. Microbiol. Oct. 1997, p.2435-2443. Minireview Laboratory Diagnosis of Pertussis: State of the Art in 1997
9. Vaccine Vol. 24. Issue 17. 2006 3513-3521. Differences of circulating *Bordetella pertussis* population in Argentina from the strain used in vaccine production
10. J. Clin. Microbiol. 53. 2004. 355-365. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK.