

A PD75660 sz. OTKA pályázat részletes szakmai zárójelentése

A PD75660 sz. OTKA pályázat 3 éve során először az invazív pneumococcus izolátumok vizsgálatára összpontosítottunk, majd áttértünk az egészséges, közösségbe járó kisgyerek garat- és orrüregében hordozott pneumococcus-ok kutatására. Jelenleg is ez képezi kutatásaink fő irányvonalát, mivel ez nagyon gyümölcsöző, érdekes, a közvéleményt is érdeklő területnek bizonyult. Ennek legfőbb oka, hogy Magyarországon éppen az utóbbi 3 év során került bevezetésre illetve terjedt el széles körben a konjugált pneumococcus vakcina alkalmazása, és ez radikálisan megváltoztatta a szerotípusok megoszlását, új helyzetet teremtve. Tulajdonképpen a teljes OTKA anyag a vakcinával kapcsolatos aspektusokkal foglalkozik. Ezek mellett néhány „mellékesebb” szálon is folytattunk kutatásokat. Először egy rövid áttekintést szeretnék adni a konjugált oltás helyzetének alakulásáról, majd lejjebb a kutatásaink és azok eredményeinek részletes leírása található pontokba foglalva.

A pályázat ugyan PD típusú, de az évek során munkámat két PhD hallgató és egy nem PhD-s kutató segítette.

Konjugált pneumococcus elleni védőoltás (Prevenar) helyzetének magyarországi alakulása

A konjugált védőoltások tekintetében éppen az OTKA pályázat 3 éve alatt (2009-től) nagy változások történtek Magyarországon. A Prevenar-7 (PCV-7) 2005 decembere óta kapható hazánkban, de magas ára miatt nemigen kérték a szülők gyermekeik oltását. 2008 októberétől azonban a Prevenar a 2 év alatti gyerekek számára ingyenessé vált, ekkor ugrásszerűen megnőtt a beoltott gyerekek száma. 2009. április 1-től a Prevenar bekerült az ún. önkéntes védőoltások közé, azaz már szerepel az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) által minden évben megjelentetett oltási naptárban, de még nem kötelező. 2009-ben az Európai Unió két újabb konjugált vakcina forgalomba hozatalát is engedélyezte: a 10-valens Synflorix-ot és a 13-valens Prevenar-13-at. 2010 augusztusában hazánkban is felváltotta ez utóbbi a korábbi Prevenar-7-et. (A számok azt jelzik, hogy a lehetséges 93 közül hány szerotípus van a vakcinában).

Ezen a téren megpróbáltam az ismereteket minél szélesebb körben a hazai közönség számára átadni (továbbképző pontszerző előadások Budapesten és Debrecenben, előadások az MMT konferencián). Egy magyar és egy angol nyelvű, kifejezetten összefoglaló jellegű cikket is megjelentettünk a témában:

Dobay O. (2010): A pneumococcus fertőzés elleni védőoltások várható hatékonysága Magyarországon. *Gyermekgyógyászat* 61:188-191., illetve O. Dobay, S.G.B. Amyes, K. Nagy (2009): The effect of the 7-valent conjugate vaccine (PCV7) on pneumococcal infections world-wide. *Reviews in Medical Microbiology* 19:79-85.

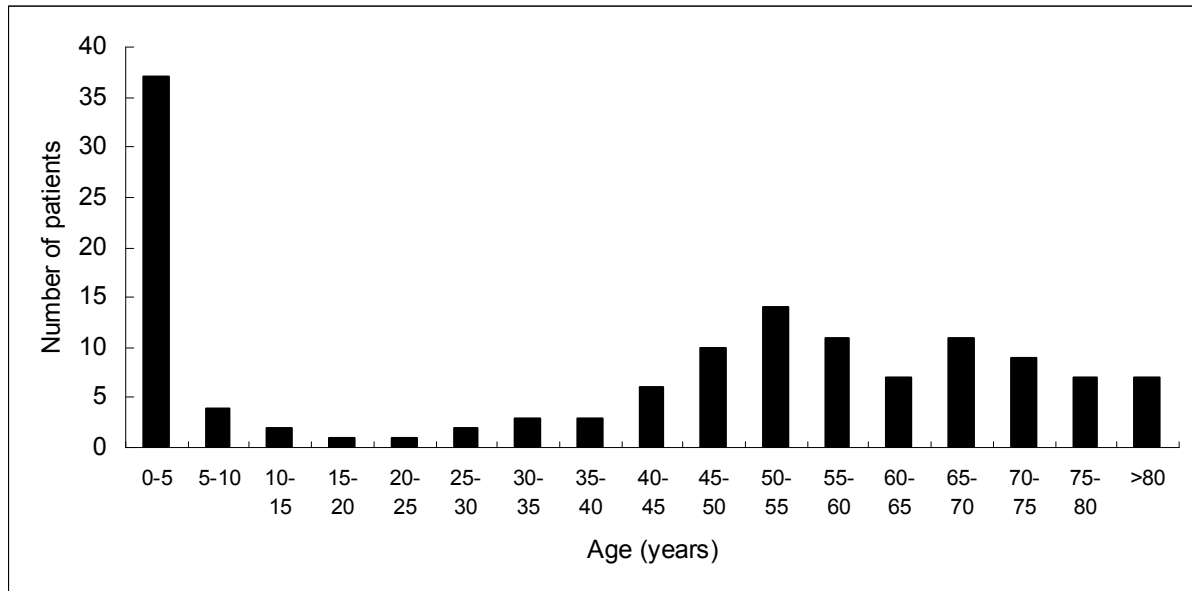
1) Konjugált pneumococcus elleni védőoltás (Prevenar) hatékonyságának vizsgálata-I:

Súlyos fertőzésekből izolált pneumococcusok felmérése

Az elmúlt évek során (2000-2008) több rutin diagnosztikai laboratóriumból (Simmelweis Egyetem Mikrobiológiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Laboratórium,

Debreceni Egészségtudományi Centrum Mikrobiológiai Laboratórium, Korányi Kórház, Nógrád megyei ÁNTSZ, Győri Petz Aladár Oktatókórház, Heim Pál Kórház) összesen 144 pneumococcus törzset gyűjtöttünk. Ezek komplex epidemiológiai felmérését végeztük el, azaz meghatároztuk az antibiotikum érzékenységüket, szerotípusukat és genetikai összetartozásukat.

A betegek életkor eloszlása a pneumococcusokra jellemző kétpúpú görbét mutatja:



Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során a MIC értékeket határoztuk meg, agarhígítási módszerrel illetve Etest-tel; a kiértékelés az EUCAST breakpointok alapján történt. Összesen 8 darab penicillin rezisztens törzset találtunk, de ezek MIC értéke is csak 2 mg/L (n=6) vagy 4 mg/L (n=2) volt. Telithromycinre és vancomycinre továbbra is 100%-os az érzékenység. A makrolid rezisztencia, ahogy eddig is, 40% körül mozog. A rezisztens törzsek nagyobbik része (n=34) nagyon magas szintű rezisztenciával (MIC>256 mg/L) rendelkezik (az *erm* gének miatt), egy részük pedig (n=20) az ún. M fenotípust mutatja (*mef* gének). A penicillin- és makrolid nemérzékenység jelentősen magasabb volt a legfiatalabb és legidősebb életkorokban, például az erythromycin rezisztencia 65.0% volt az 5 évesnél kisebb gyerekek esetén és 83.3% a 80 év felettek esetén, ugyanakkor csupán 26.9% a 15-70 éves korosztályban (p<0.0001).

A hagyományos antiszérumos módszer és multiplex PCR ötvözésével összesen 136 törzset tudtunk sikeresen szerotipizálni (=94,4%), ami nagyon jó aránynak számít. A leggyakoribb szerotípusok a következők voltak: 14 (n=25), 6A (n=14), 6B (n=11), 23F (n=11), 3 (n=9), 11A (n=7), 19F (n=7), 19A (n=5), de összesen 22 féle szerotípust sikerült kimutatni. Ezen adatok alapján a konjugált védőoltások lefedettségi aránya a következőképpen alakul:

Vakcina	Összes törzs (n=136)	Szigorúan invazív törzsek (n=71)	Pneumonia törzsek (n=62)
Prevenar-7	72.1 %	67.6 %	75.8 %
Synflorix™	77.2 %	71.8 %	82.3 %
Prevenar-13	87.5 %	87.3 %	87.1 %

Az invazív és a légúti megbetegedést okozó törzsek vakcina-lefedettsége közötti különbség arra vezethető vissza, hogy az egyes szerotípusok gyakran összefüggést mutatnak a betegség típusával (pl. 3-as típus szinte kizárólag hemokultúrában fordult elő, míg a 19F főleg a légúti fertőzésekre jellemző). A Prevenar-13 viszont éppen a jellemzően invazív szerotípusokkal bővült ki (3, 6A, 19A), ezért a különbség itt már kiegyenlítődik.

A törzsek genetikai összetartozását pulsed-field gélelektroforézissel (PFGE) vizsgáltuk. A genetikai diverzitás meglehetősen nagy volt (a 6-os, 14-es és a 19-es szerotípusok különösen diverzek voltak), de néhány kisebb klón jelenlétét igazolni lehetett. Szerotípus váltásra is találtunk példákat, azaz amikor egy törzs genetikai állományát megtartva poliszacharid tokját lecseréli.

Az eredményeket (több kongresszusi anyag mellett) a következő cikkben foglaltuk össze: O. Dobay, Á. Ungvári, Sz. Kardos, et al (2010): Genotypic and phenotypic characterisation of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Hungary, and coverage of the conjugate vaccines. *Journal of Clinical Pathology* 63:1116-20.

A szerotipizálás metodikai beállításáról szóló cikk a következő: O. Dobay, E. Juhász, Á. Ungvári, et al (2009): Taguchi optimisation of a multiplex pneumococcal serotyping PCR and description of 11 novel serotyping primers. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56:327-338.

2) Konjugált pneumococcus elleni védőoltás (Prevenar) hatékonyságának vizsgálata-II: Pneumococcus hordozás felmérése óvodásokban

A pályázat harmadik évében már ez volt a domináló kutatási vonal. Ezen a témán az egyik (jelenleg harmadéves) PhD hallgatómmal közösen dolgozunk, ez képezi a hamarosan beadandó disszertációjának anyagát is (szigorlat már megtörtént). Mivel a konjugált pneumococcus oltások a betegséget okozó izolátumok mellett bizonyítottan hatással vannak a törzsek hordozására is, célunk volt közösségbe (óvodába) járó kisgyerekek tünetmentes pneumococcus hordozásának felmérése és a vakcinák hatásának vizsgálata.

A pályázat 3 éve alatt országszerte összesen **856 kisgyerektől** sikerült mintát venni, és ebből 324 esetben pneumococcust izolálni (hordozási arány: 37,85%).

A 3 év alatt egyértelmű tendencia figyelhető meg: a gyerekek Prevenarral való oltottsága meredeken emelkedett, a kezdetben tapasztalható csekély arány után az utóbbi időben néhány csoportban akár az 50%-ot is meghaladta. Tekintetbe véve, hogy az Epiinfo adatai szerint mára az átoltottság közelíti a 100%-ot, ugyanakkor a Prevenart a gyerekek még óvodás koruk előtt (2, 4 és 15 hónapos korban) kapják, az első olyan óvodás csoport, ahol akár az összes gyerek oltva lesz, idén, azaz 2012 őszétől várható. Rendkívül érdekes ezt a dinamikus változó időszakot élőben nyomon követnünk és izgatottan várjuk a további változásokat.

A 324 törzs közül 305-öt tudtunk sikeresen szerotipizálni (=94,1%). A vakcinálás természetes és eddig minden országban megfigyelt következménye, hogy a korábban jellemző szerotípusok helyett/mellett olyanok válnak gyakoribbakká, amelyek nem szerepelnek a Prevenarban. Nálunk is élesen megjelennek ezek a változások. Az átoltottság mértéke alapján a gyerekeket két csoportba osztva, a korai esetekben még a korábban világszerte (és így nálunk is) domináló ún. pediatrikus típusok (6A/6B: 22,1%, 14: 20,2%, 23F és 19F: 17,3%) voltak a leggyakoribbak, míg az oltottság növekedésével újabb típusok (11A, 15B) törtek előre. Az új sorrend: 11A (19,9%), 6A/6B (14,9%), 15B (11,3%), 25/38 (9,5%). A 14-es szerotípus gyakorlatilag eltűnt a hordozott törzsek közül! Ugyanakkor a 6A és 6B típusok

csak kisebb mértékben szorultak vissza, és jobban képesek tartani a versenyt az újabbakkal. Néhány egész ritka szerotípus is megjelent, mint pl. 16F, 10A, 22, tehát a talált szerotípusok száma is megnőtt.

Ezek alapján természetesen a vakcina lefedettség is nagymértékben magváltozott: a Prevenar-13 esetében a kezdeti 78,9%-ról lecsökkent 37,9%-ra.

A hordozott törzsek jellemzően sokkal érzékenyebbek az antibiotikumokkal szemben, mint betegségéből izolált társaik. Penicillin rezisztens törzset egyáltalán nem találtunk, a magasabb MIC értékek (0,5-2 mg/L) pedig inkább a régi szerotípusokra (14, 23F, 19F) jellemzőek. Legszámottevőbb még a makrolid rezisztencia, de ez is sokkal alacsonyabb, mint a patogének esetében (ott kb. 40%), és az első csoport 26%-os rezisztenciája a második (átoltottabb) csoportban lecsökkent 14%-ra. Általánosságban elmondható, hogy szerencsére a régi szerotípusokat felváltó újak - egyelőre legalábbis – még az eddigieknél is érzékenyebbek, azaz nem jelent gondot a célzott antibiotikus terápiájuk. Vagyis eredményeink alapján a konjugált oltás egyértelműen javasolható a gyerekeknek, hiszen hatására a korábbi, rezisztensebb szerotípusok drasztikusan visszaszorulnak, és helyettük veszélytelenebb típusok kezdik kolonizálni a felső légúti nyálkahártyát. Kérdés persze, hogy ezek rezisztensebbekké fognak-e válni idővel.

Jellemző az egyes óvodai csoportokon belüli nagyon erős klonalitás, mutatva a gyerekek közötti intenzív flóracserét.

Kiemelném, hogy soha Magyarországon nem történt ennyi szerotipizálás eddig, mint amennyit mi végeztünk a pneumococcus vizsgálatok keretében.

Az eddigiekben leírtak mellett az utóbbi fél év során újabb érdekes felmérésbe kezdtünk: egy átlagos magyarországi kisváros (Szolnok) összes (=20) óvodájába járó 1700 gyerek pneumococcus hordozását szeretnénk megvizsgálni. Ennek megszervezésében nagy segítségünkre volt a helyi óvodák főnöknője. Eddig közel 1000 kisgyerektől megtörtént a mintavétel, az izolált törzseket gyűjtjük, de még nincsenek földolgozva. Ezenkívül a következő 1-2 év során az elsőként leszűrt óvodákba is szeretnénk visszamenni, hogy közvetlen összehasonlítást végezhessünk egy-egy adott földrajzi helyen. Vagyis a kutatás még sokáig folytatódni fog ezen a vonalon és sok érdekes eredményre számítunk.

Az eddig feldolgozott eredményekről a 20. és 22. ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) kongresszusokon (2010. április, Bécs; 2012. március, London), magyar kongresszusokon, illetve két folyóiratcikk formájában számoltunk be:

A. Tóthpál, Sz. Kardos, E. Hajdú, K. Nagy, M. van der Linden, O. Dobay (2012): Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Hungarian children before the wide use of the conjugate vaccine. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **59**:107-118.

A. Tóthpál, A. Ordas, E. Hajdú, Sz. Kardos, E. Nagy, K. Nagy, O. Dobay (2011): A marked shift in the serotypes of pneumococci isolated from healthy children in Szeged, Hungary, over a 6-year period. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **58**:239-246.

A témában újabb kézirat megírása folyamatban van, melyet „Drastic changes in pneumococcal serotypes of healthy children within just 2 years after the wide spread use of PCV-7” címmel szeretnénk hamarosan egy komolyabb folyóirathoz (pl. *Vaccine*) beküldeni.

3) Pílusok jelenléte pneumococcusokon

Mint ahogy arról már a második évi jelentésben is beszámoltam, nemrég felfedezték, hogy akár a pneumococcusok egyharmadának csillója van. Ez korábban ismeretlen volt, tokos baktériumról lévén szó. Természetesen a csillók jelenlétének nagy szerepe lehet a baktériumok kolonizációs képességének javításában, ami a pneumococcusoknál különösen fontos jelentőségű, mert szinte minden esetben az orrban illetve torokban való megtelepedés előzi meg a fertőzést. Ezért – ugyan a munkatervben ez még nem szerepelt – ebben az irányban is elkezdünk vizsgálni. Első lépésként PCR-rel mutattuk ki a csillók jelenlétét két jól elkülöníthető csoportban: fertőzéseket okozó klinikai izolátumokban, illetve az egészséges óvodások orrából izolált törzsekben.

Az eredmények azt mutatják, hogy a betegséget okozó törzsekben sokkal gyakoribb a csilló jelenléte: 100 törzsből 24-ben volt kimutatható (=24%), szemben a hordozott törzsek mindössze 15.4%-os pozitivitásával (156 törzsből 24). A csillós törzsek feltűnően rezisztensebbek voltak a többinél (makrolid rezisztencia, illetve emelkedettebb MIC értékek penicillinre). A csillós pneumococust hordozó 24 gyerek közül csupán kettő volt korábban oltva Prevenarral. Ez azzal magyarázható, hogy a csillók jelenléte elsősorban a „sikeresebb” szerotípusokban fordul elő (pl. 6, 14, 19F), amelyek gyakrabban okoznak betegséget (talán részben éppen a csilló miatt?!), és ezért a Prevenar oltást ezek ellen tervezték. Vagyis elmondható, hogy a Prevenarral való vakcinálás ilyen áttételesen is hozzájárul a pneumococcusos fertőzések számának csökkenéséhez.

Az eddigi eredményeket poszter formájában a 21. ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) kongresszuson mutattuk be (Milánó, 2011. május), valamint egy TDK hallgató a Semmelweis Egyetem-i TDK kongresszuson (2011. február) második helyezést ért el az anyaggal.

4) Pneumococcusok biofilm képző képességének vizsgálata

A pílusok vizsgálata kapcsán adódott az ötlet, hogy meg kell nézni a törzsek biofilm képző képességét is. Ez a tulajdonság szintén fontos szerepet játszhat a nyálkahártya kolonizáció sikerességében.

A biofilm képzés mérésére egy már ismert technikát fejlesztettünk tovább. Ennek lényege, hogy a törzseket overnight tenyésztés után reggel frissen beoltjuk BHI táplevesbe, majd 4-5 óra elteltével a szuszpenzió sűrűségét beállítjuk egységesen 3 McFarland-ra. 96 lyukú plate-re 4 párhuzamos mérésben tesszük ki a szuszpenziókat. 24 órás, illetve 48 órás, 37°C-os CO₂ termosztátban való ráztatás után a le nem tapadt sejteket kiöntjük, 3x öblítünk PBS oldattal, majd szárítás után a letapadt baktériumokat megfestjük 0,1%-os kristályibolya oldattal. A megkötött festéket 96%-os etanollal kioldva, a kapott lila oldat optikai denzitását (OD) visszamérve következtetni lehet a baktérium mennyiségre. Ez a módszer rendkívül jól bevált és pontosan tükrözi a szabad szemmel is érzékelhető különbségeket, széles OD tartományban széthúzódva. A módszer beállítása elég sok időt igénybe vett.

Első menetben a pílussal rendelkező illetve nem rendelkező törzseket hasonlítottuk össze (azonos szerotípusokon belül), és azt tapasztaltuk, hogy a pílus + törzsek 24 órára ugyan kevésbé jól tudnak biofilmet képezni, azonban 48 órára már legyőzik pílus-negatív társaikat. Következő lépésként a klinikai izolátumokat hasonlítottuk össze a hordozott törzsekkel, és kivétel nélkül minden esetben sokkal (akár 30-40%-kal is) erősebb biofilm képzést tapasztaltunk a hordozott törzsek esetében. Ez logikusan magyarázhatja meg azt, hogy miért éppen az adott törzsek tudtak könnyebben megtapadni a nyálkahártyán. Végül különböző szerotípusú törzseket hasonlítottunk össze egymással, és itt az előzetes eredmények érdekes dolgot mutatnak. Míg 24 órára az ún. „pediatrikus” szerotípusok (korábban világszerte

elterjedt, sikeres klónok, pl. 14, 23F, 18C, 19A) bizonyultak erősebbnek, 48 órára azonban az újonnan izolált, eddig ritkának számító, előretörően levő szerotípusok (pl. 15B, 13, 3) túlnövik őket. Ez a jelenség, természetesen a vakcinálás elsődleges hatása mellett, hozzájárulhat ahhoz, hogy a régieket leváltó új szerotípusok közül miért éppen ezek váltak sikeressé az utóbbi időben és miért nem mások.

Ebből az anyagból egyelőre nem született publikáció, de nagyobb számú izolátum vizsgálata után a későbbiekben természetesen ezt is tervezzük.

5) Egy régi-új antibakteriális szer tesztelése különböző rezisztencia-szintű pneumococcus izolátumokon

Egy 1950-es években kifejlesztett, de később hanyagolt antibakteriális hatású vegyületet teszteltünk különböző, elsősorban multi-rezisztens Gram-pozitív baktériumokon (pl. MRSA, VRE). Ezek között szerepelt 20, különböző rezisztencia-szintű pneumococcus izolátum is. Az eredmények meglepő hatásosságot mutattak az összes vizsgált Gram-pozitív izolátum ellen. A pneumococcusok esetében, noha azok penicillin MIC értéke 0,015 és 16 mg/L között változó értékeket mutatott, és az izolátumok 11 féle szerotípust képviseltek, a vizsgált antibiotikum stabilan alacsony, 0,5-1,0 mg/L MIC értékkel rendelkezett. Az eredményeket összefoglaló kéziratot "... shows high in vitro efficacy against multiresistant Gram-positive bacteria" címmel a napokban küldte be az első szerző a Journal of Antimicrobial Chemotherapy-hoz. (A szer nevét a cikk megjelenéséig nem írhatom le, a címben azt ... helyettesíti).

Jövőbeli tervek

A fentiekén kívül egy másik, közeli Streptococcus fajjal, a *Str. agalactiae*-vel (GBS, G-csoportú streptococcus) is elkezdtünk foglalkozni. Ezt a munkát kis kutatócsoportom egyik tagja végzi, és részben ez képezi az alapját az idén benyújtott OTKA pályázatnak, ahol a pneumococcuson kívül két másik Gram-pozitív baktérium (*Str. agalactiae* és *S. aureus*) hordozása lenne a téma. Éppen a pneumococcus hordozással kapcsolatos kutatások eredményességén és sikerén felbuzdulva terjesztjük ki a baktériumok körét. A GBS esetében természetesen nem a közösségbe járó kisgyerekek garat- és orrüregében való hordozást szeretnénk fölmérni, hanem a terhes nők hüvelyi baktérium hordozását. Ennek a baktériumnak a jelenléte az esetek kb. felében a szülés során az anyáról a magzatra való átadást eredményezheti. Legtöbbször szerencsére csak külső (pl. fül) kolonizáció jön létre, de kb. 1%-os gyakorisággal a GBS súlyos, életveszélyes fertőzéseket (meningitis, sepsis) okoz az újszülöttnél. Éppen ezért a terhesség végén elvégzett GBS szűrés rendkívüli fontosságú. A jelenlegi magyarországi GBS epidemiológiai helyzet gyakorlatilag ismeretlen, és ehhez szeretnénk hozzájárulni felmérésünkkel. Eddig a Semmelweis Egyetem különböző klinikáiról származó közel 300 izolátumot vizsgáltunk meg. Egyrészt azt találtuk, hogy hazánkban is nagyon gyakori a III-as szerotípus, de a többi is előfordul. Másik fontos eredmény, hogy az ST-17-es hiper-virulens klón az izolátumok egyharmadát teszi ki, és különösen gyakran található az újszülöttek mintáiban.

Az eddigi eredményeket a 22. ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) kongresszuson (London, 2012. március) közzétettük, poszter formájában (P1003).