

Tartalom:

***Clostridium difficile* infekció (CDI) Magyarországon; diagnosztika, epidemiológia munkaértekezlet programja (Budapest, 2015. április 9.)**

Történeti áttekintés, a „CDI Europe” céljai és az elért eredmények (eredeti prezentáció)

Nagy Erzsébet

***Clostridium difficile* fertőzés – evidenciákon alapuló általános tudnivalók – hogyan gondolkodjunk?**

Rákóczi Éva

A *Clostridium difficile* infekciók mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei

Urbán Edit

***Clostridium difficile*: a hazai laboratóriumi diagnosztika felmérése 2014-ben**

Pásztai Judit

A *Clostridium difficile* infekciók hazai járványügyi helyzete a surveillance jelentések alapján

Kurcz Andrea, Hajdu Ágnes, Szőnyi Katalin, Strupka Veronika, Nyolczas Szilvia

Hazai tipizálási adatok 2000 és 2010 között

Terhes Gabriella, Nagy Erzsébet, Urbán Edit

Egy 2014-es hazai felmérés eredménye „capillary gel electrophoresis-based” PCR ribotipizálás módszer alkalmazásával

Tóth Judit, Fekete Eszter, Terhes Gabriella, Indra Alexander Pecavar Verena, Kaltenecker Borbála, Benczik Márta, Urbán Edit, Osztie Hilda, Latkóczy Krisztina, Nagy Erzsébet

A rendezvény fővédnöke: Astellas Pharma Kft.

***A Mikrobiológiai Körlevél ezen számának támogatói:
Biolab Zrt., Biomedica Hungária Orvostechnikai Kft.,
bioMérieux Hungária Kft., Buda Labor Kft.,
Chemium Kft., Diagnosticum Zrt.***



Kiadja: Országos Epidemiológiai Központ

A kiadó és a szerkesztőség székhelye: 1097 Budapest, Albert Flórián út 2-6.

Alapító szerkesztők:

Dr. Füzi Miklós (Ph.D.)

Dr. Gacs Mária

Felelős szerkesztő:

Dr. Visontai Ildikó

Szerkesztő:

Dr. Csire Márta (Ph.D.)

Dr. Tirczka Tamás

Dr. Tóth Ákos (Ph.D.)

Technikai szerkesztő:

Ertlne Czinege Ildikó

Huszár Csilla

Olvasó szerkesztő:

Dr. Gacs Mária

Készült az Országos Tisztifőorvosi Hivatal nyomdájában
180 példányban

Nyomdavezető: Novák Anikó

ISSN 2063-9805 (Nyomtatott)

ISSN 2063-9813 (Online)

Hazai tipizálási adatok 2000 és 2010 között

Terhes Gabriella, Nagy Erzsébet, Urbán Edit

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Szeged

A 027-es PCR ribotípusú *Clostridium difficile* (*C. difficile*) törzs által okozott nagy kiterjedésű járványokkal a törzsek molekuláris tipizálása is egyre nagyobb hangsúlyt kap. A tipizálási módszerek segítségével követhetjük a CDI-t (*C. difficile* Infection) és az általa okozott járványokat, adatokat kaphatunk az egyes törzsek regionális vagy globális terjedéséről, követhető egy-egy virulensebb törzs cirkulációja.

Az elmúlt években ennek köszönhetően számos molekuláris tipizálási módszer terjedt el a törzsek típusának meghatározására. Minden esetben az alkalmazott módszert úgy érdemes megválasztani, hogy a törzsek nagy része tipizálható, az alkalmazott módszer megfelelően diszkriminatív, reprodukálható és könnyen kivitelezhető legyen. Az alkalmazott módszerek alapvetően két nagy csoportba sorolhatók. Az 1980-as években a fenotipizálási, míg későbbiekben a genotipizálási módszerek terjedtek el. A fenotipizálási módszereket elsősorban alacsony reprodukálhatóságuk, alacsony diszkriminatív tulajdonságuk miatt kiszorították a genotipizálási módszerek, amelyek alapvetően két nagy csoportba sorolhatók: a band-alapú módszerek és a szekvencia alapú módszerek. Az 1990-es évek elejétől a band-alapú, míg a 2000-es évektől a szekvencia alapú módszerek terjedtek el. A band-alapú módszerek közül a legismertebb a hagyományos vagy kapilláris PCR ribotipizálás, a REA (Restriction Endonuclease Analysis), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), toxinotipizálás, MLVA (Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis). A szekvenálás alapú módszerek közül az MLST (Multilocus Sequence Typing) a legismertebb, míg a teljes genom szekvenálás, ugyan ígéretesnek mutatkozik, de a jelenlegi költségei miatt, csak néhány külföldi laboratóriumban elérhető. Európában főként a PCR ribotipizálás terjedt el, elsősorban a módszer egyszerűsége, a többi módszerhez képest alacsony költségigénye és gyors kivitelezhetősége miatt. A módszer alapjait Gutler és mtsai rakták le, a PCR a 16S és 23S rRNS-t kódoló gének által közrefogott ISR (Intergenic Spacer Region) szakaszok amplifikálásán és a keletkezett PCR fragmentumok gélelektroforézissel történő szétválasztásán és detektálásán alapszik.

Az elmúlt években az alap módszert számos kutatócsoport módosította. Voltak olyan változások, amelyek a primereket, míg mások a PCR körülményeket vagy a detektálási lépéseket módosították, ezért ma már lehetetlen (az amúgy is detektálási lépésekre érzékeny módszer esetén) az egyes országok adatainak összehasonlító vizsgálata. Sőt körvizsgálatok eredményei azt is kimutatták, hogy egy országon belül, a minden tekintetben azonos módszer

használata ellenére is, az egyes centrumok esetén eltérőek az eredmények. Jelenleg több mint 400-féle különböző ribotípus ismert, az egyes típusokra vonatkozó jellegzetességek pl.: band mintázat a nagyobb centrumokban többnyire korlátozott mértékben elérhető. A legtöbb európai ország egy korábbi vizsgálatsorozat segítségével hozzájuthatott az Európában leggyakrabban előforduló néhány ribotípust tartalmazó törzsgyűjteményhez, amelyet felhasználhatott a saját PCR ribotipizálási könyvtár kiépítéséhez. Ez azonban csak töredéke a már említett több mint 400 törzsnek, teljes könyvtár hiányában pedig nem határozhatók meg a ritkábban előforduló PCR ribotípusok. Mindezen korlátok miatt a PCR ribotipizálás jelenleg csak helyi összehasonlításokra, helyi járványok felismerésére alkalmazható. Egységes nevezéktan hiányában és a PCR ribotipizálást érintő apró változások miatt mára szinte lehetetlen az egyes országok adatainak összehasonlítása. PCR ribotipizálás esetén a termékek elválasztása során felmerülő problémák megoldására az elmúlt években egyre több országban alkalmazzák a kapilláris gélelektroforézist, amellyel a hagyományos módszerhez képest a szubjektivitás kiküszöbölhető, a detektálás standardizálása is egyszerűbb, de nem oldja meg a PCR ribotipizálási könyvtárral és a nevezéktannal kapcsolatos problémákat.

Szintén Európához (elsősorban Szlovéniához) köthető a toxinotipizálási módszer, amely esetén a PaLoc (Pathogenecity Locus) régió különböző szakaszait, elsősorban a fő toxinokat kódoló géneket és a regulátor régiókat PCR módszerrel amplifikálják, majd restrikciós enzimekkel emésztik. A keletkezett termékeket agaróz gélelektroforézissel szeparálják és a kapott mintázat alapján történik az egyes típusok meghatározása. Az eredmények ugyan jól reprodukálhatók, de a diszkriminatív jellege a módszernek alacsony, egy toxinotípuson belül akár több PCR ribotípus is elkülöníthető ezért az epidemiológiai vizsgálatok során ritkán alkalmazzák.

Észak-Amerikában viszont a leggyakrabban alkalmazott tipizálási módszer a PFGE. A módszer alapja a genomiális DNS hasítása restrikciós enzimmel és a keletkezett termékek szeparálása PFGE segítségével. A módszert számos élelmiszer közvetítette patogén esetén alkalmazzák sikeresen, sikerült standardizálni és validálni, de ezek az erőfeszítések a *C. difficile* esetén kudarcba fulladtak. Munka- és időigényessége miatt ezt a módszert Európában szinte egyáltalán nem alkalmazzák. Az európai és amerikai eltérő irányvonal miatt, számos problémát okozott, hogy több közleményben az egyes törzsekhez többféle típus meghatározási eredményt is közöltek, amely a típusok számának növekedésével követhetlenné vált.

Az elmúlt években egyre gyakrabban alkalmazzák az MLST technikát, amely 7 háztartási gén 300 és 500 bp közötti szakaszának szekvencia meghatározásán alapul. Az MLST eredmények interpretálása objektív, jól reprodukálhatók és lehetőség van a laboratóriumok közötti információcserére, ezáltal az eredmények is összehasonlíthatók, ingyenesen elérhető egy MLST

könyvtár, ahová az egyes szekvenciák feltölthetők. Mindezen előnyök ellenére, sajnos a módszer terjedésének gátat szab a magas szekvenálási költség. Ugyanezen ok miatt a teljes genom szekvenálás szintén háttérbe szorul és csak néhány laboratórium esetén van lehetőség a módszer alkalmazására.

Magyarországon az elmúlt években évről évre követtük a *C. difficile* törzsek cirkulációját. 2001-ben 65, míg 2006-ban 105 törzs PCR ribotípusát határoztuk meg az eredeti a cardiff-i Anaerob Referencia Laboratóriumban kidolgozott módszerrel. Az első vizsgálati időszak alatt a 087, 012 és 001 PCR ribotípusok előfordulása volt számottevő, míg a második vizsgálati időszak alatt 014 és 002 PCR ribotípusok domináltak. A 2006-ban publikált eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy nemcsak vizsgálati időszakonként, de az országon belül az egyes régiókban is eltér az egyes PCR ribotípusok előfordulása. Szintén eltérő ribotípusok fordultak elő a fekvő-és járóbetegek esetén. 2007-ben az ország különböző területeiről származó *C. difficile* törzsek vizsgálata során találtunk egy olyan binary toxin-termelő törzset, amely a törzs további vizsgálatai során 027-es PCR ribotípusnak bizonyult. Az eset érdekessége volt, hogy ugyanezen időszak alatt a 027-es PCR ribotípus már kiterjedt járványt okozott Észak-Amerikában és számos európai országban, ugyanakkor a hazai törzsek között ebben az időszakban csak ez az egyetlen törzs bizonyult 027-es PCR ribotípusnak. Az epidemiológiai vizsgálatok során a binary toxin-termelő törzsek előfordulása a hazai toxintermelő törzsek között 1,9-5,3%-os volt, míg 2010-ben 101 törzs vizsgálata során a binary toxin-termelő törzsek előfordulása 42,6%-nak bizonyult. A nagymértékű emelkedés felhívta a figyelmet, egy esetleges binary toxin-termelő törzs által okozott járványra, mindezek miatt egy intenzív törzsgyűjtés indult 2010. májusától 2011. decemberéig. Ennek eredményeképpen 1.085 *C. difficile* törzs vizsgálatára került sor. A törzsek, mintegy 74,1%-a bizonyult A és B toxin pozitívnek, ezen törzsek 46,2%-a volt binary toxin-termelő. A binary toxin-termelő törzsek 97,8%-a pedig a 027-es PCR ribotípusba volt sorolható. A laboratóriumunkba küldött törzsek 20,7%-a nem volt alkalmas molekuláris vizsgálatra, ennek fő oka a törzsek nagyfokú szennyezettsége volt, valamint a nem megfelelő identifikálás.

A hazai és nemzetközi vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a *C. difficile* PCR ribotípusok megoszlása vizsgálati időszakonként, földrajzi területenként, kórházanként, járó-fekvőbetegek esetén is eltér. Hazánkban, mint ahogy számos európai országban 2010. óta jelentős problémát okoz a 027-es PCR ribotípusú törzs gyakori előfordulása, valamint a törzs által okozott helyi járványok. Az egyre gyakrabban megfigyelhető járványok miatt szükséges egy megfelelő, kellően diszkriminatív tipizálási módszer hazai alkalmazása és a törzsek cirkulációjának meghatározott időnként történő követése, amelyre a PCR ribotipizálás elérhető módszer, még hazai viszonyok mellett is.

Ugyanakkor mindenképpen szükséges a sikeres munkához a hazai laboratóriumok együttműködése, a megfelelő minőségű tenyészetek vagy minták biztosítása és a megfelelő szintű adatszolgáltatás.

Irodalom

1. Knetsch CW, Lawley TD, Hensgens MP, Corver J, Wilcox MW, Kuijper EJ: Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. Euro Surveill 2013, 18: 20381.
2. Terhes G, Brazier JS, Urbán E, Sóki J, Nagy E: Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary. J Med Microbiol 2006, 55: 279-282.
3. Terhes G, Urbán E, Konkoly-Thege M, Székely É, Brazier JS, Kuijper EJ, Nagy E: First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 from a patient with severe persistent diarrhoea in Hungary. Clin Microbiol Infect 2009, 15: 885-886.
4. Urbán E, Brazier JS, Sóki J, Nagy E, Duerden BI: PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. J Med Microbiol 2001, 50: 1082-1086.