

**Európai Járványügyi és Betegségellenőrzési Központ, Stockholm,
Svédország**

European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden

**Újabb diagnosztikai- és molekuláris
epidemiológiai módszerek alkalmazása és szerepe
a tuberkulózis elleni küzdelemben**

Ph.D. Tézisek

Ködmön Csaba

2011

Szeged

1. Bevezető

A *Mycobacterium* genus tagjai széleskörűen fordulnak elő a természetes ökoszisztémákban. Legtöbb tagja nitrogénkötő aktivitásuk és szervesanyag bontó képességük folytán a talaj és a felszíni víztakaró hasznos és nélkülözhetetlen lakója. Néhány *Mycobacterium* faj az evolúció során kórokozóvá vált. Ezek közül is a *Mycobacterium tuberculosis* complexhez (TBC) tartozó *M. tuberculosis* és *M. bovis* a legjelentősebb. A *Mycobacterium tuberculosis* complex okozta fertőzés eredményeképp kialakuló kórkép a tuberkulózis, amely leggyakoribb formája a tüdőtuberkulózis. Mivel a tuberkulózisra utaló tünetek nem specifikusak, a laboratóriumok kiemelkedő szerepet töltenek be a tuberkulózis diagnózisának felállításában, a gyógyszer-érzékenység megállapításában, az alkalmazott terápia hatékonyságának monitorozásában és a fertőzés transzmissziójának megakadályozásában. A mellkas röntgenfelvételek alapján a tuberkulózis gyanúja jól megalapozható, de számos más tüdőbetegség is hasonló képet adhat. Továbbá, a mellkas röntgenfelvételek alapján nem lehet elkülöníteni az aktív tuberkulózist a már lezajlottól. Ezért, a laboratóriumi eredményeknek nem csak pontosnak kell lenniük, hanem gyorsan hozzáférhetőnek is. Ez indokolta a *Mycobacteriumok* laboratóriumi diagnosztikájában használt módszerek fejlesztését a XX. század második felében.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a tuberkulózist 1993-ban világméretű vészhelyezetté nyilvánította. A WHO megállapítása szerint az emberiség 1/3-a *M. tuberculosis*-sal fertőzött. Évente a *M. tuberculosis* 8-10 millió embert fertőz meg és 3 millió ember halálát okozza. Jelenleg a tuberkulózis vezeti az egy kórokozó által okozott halálozási statisztikát, és az elkerülhető halálozások kb. 25%-ért felelős világszerte. A WHO előrejelzése alapján 2000 és 2020 között közel 1 milliárd ember válik újonnan fertőzötté és ezek közül várhatóan 200 millió egyénben ez a fertőzés klinikai

megbetegedéshez is vezet majd. A fent említett 200 millió ember közül 35 millió beteg menthetetlenül meghal, amennyiben a tuberkulózis elleni védekezés hatékonysága nem javul számottevően a jövőben. A tuberkulózis ismételt világméretű fellángolásában elsősorban gazdasági és szociális tényezők, a HIV vírus és a tuberkulózis közötti szinergizmus, és a XX. század végén komoly fenyegetésként megjelent rezisztens és multidrog rezisztens tuberkulózis (MDR, rezisztencia legalább isoniacidra és rifampicinre) terjedése játszik kiemelkedő szerepet.

A tuberkulózis járványügyi helyzete szempontjából az európai országok három fő csoportba oszthatóak fel. A nyugat-európai országok többségében a 100.000 lakosra számított incidencia 20 alatt van, és évről-évre csökken. Ezekben az országokban a tuberkulózis járvány az u. n. "eliminációs" szakaszához közelít. Kelet-Európában súlyosnak mondható a tuberkulózis helyzet. Oroszországban és a volt Szovjet Tagköztársaságokban az incidencia a 100/100.000 lakos körüli, sok esetben magasabb értéket mutat. Az Európai Unió (EU) legsúlyosabb a helyzet Romániában van, ahol 2008-ban 115,1/100.000 lakos volt az incidencia. A két terület között, Közép-Európa intermedier helyzetben van: folyamatosan csökkenő mutatók mellett Szlovénia, a Cseh Köztársaság és Szlovákia incidenciája valamivel 20 alatt van, a többi országban 20 és 50/100.000 közötti éves incidenciát regisztrálnak.

A hazai tuberkulózis járváynak az 1950-es évek óta tartó kedvező tendenciája 1990-ben tört meg. Az addig folyamatosan csökkenő incidencia 1990 és 1995 között 19%-al emelkedett (1990: 34/100000 lakos; 1995: 42/100000 lakos). A kedvezőtlen tendencia visszafordítására és a betegség visszaszorítására irányuló erőfeszítések optimalizálása céljából 1994-ben a Tüdőgyógyászati Szakmai Kollégium Nemzeti Tuberkulózis Programot fogadott el. A tuberkulózis incidencia 1996 óta újra folyamatosan csökken.

Az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) jelentése szerint 2009-ben az incidencia 14,4/100000 volt Magyarországon. Az incidencia látványos csökkenése ellenére a halálos kimenetelű *M. tuberculosis* által okozott fertőzések száma az elmúlt évek során közel azonos volt. Az újonnan diagnosztizált betegek számának csökkenése ellenére a mortalitási ráta stagnál. E jelenségnek mindenekelőtt a beteg–kooperációban és a betegvezetésben gyökeredző okai lehetnek, valamint a tuberkulózisban szenvedő betegek növekvő átlag életkora. A hazai megbetegedési viszonyoknak már fél évszázada egyik szomorú jellegzetessége a bakteriológiailag igazolt esetek alacsony aránya. További problémát jelent, hogy a *Mycobacteriumok* bakteriológiai diagnózisát kérő szakorvos választja meg az alkalmazandó tenyésztési módszert. Így, az olcsó, de alacsony szenzitivitású szilárd táptalajon való tenyésztést kéri túlnyomó többségben, egyes laboratóriumok esetében ez az arány elérheti akár 95%-t is. Magyarországon a tuberkulózis incidenciája jelentős területi eltéréseket mutat. Az új megbetegedések több mint felét Északkelet-Magyarországon és Budapesten regisztrálják.

2. Célkitűzések

- I. Az új, teljesen automatizált, nem radiometriás BacTec MGIT 960 folyékony alapú tenyésztési módszer bevezetése a Semmelweis Egyetem ÁOK Pulmonológiai Klinika Mycobacteriológiai Laboratórium rutin diagnosztikájába, valamint annak összevetése a folyékony alapú félautomata, radiometriás BacTec 12B és a hagyományos szilárd alapú Löwenstein-Jensen tenyésztési módszerrel. Meghatározni a legköltséghatékonyabb tenyésztési megoldásokat a Magyarországon működő alacsony, valamint magas éves mintaszámot feldolgozó laboratóriumok számára.
- II. Az Inno-LiPA Rif. TB Test (Innogenetics N. V., Ghent, Belgium) PCR-alapú DNS-reverzhibridizációs módszer bevezetése a Semmelweis Egyetem ÁOK Pulmonológiai valamint annak összevetése a hagyományos rezisztencia-meghatározásra alkalmas módszerekkel és DNS-szekvenálással.
- III. Az IS6110 RFLP-fingerprint és a Spoligotyping módszerek bevezetése a járványügyi érdekből végzett vizsgálatok elvégzésére Magyarországon. A Magyarországon izolált rifampicin-rezisztens törzsek genotipizálása és járványügyi elemzése.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A BacTec MGIT 960, a BacTec 12B és a Löwenstein-Jensen tenyésztési módszerek összehasonlítása

Minták

Összesen 243 betegtől származó 377 klinikai mintát (288 köpet, 51 hörgőmosó folyadék vagy hörgőszivadék, 32 gyomornedv és 6 pleurapunctátum) vizsgáltunk meg, melyeket 1999.03.29-05.31. időszakban gyűjtöttünk. Minden beteg HIV negatív volt. A mintákat a Kent és Kubica által leírt N-acetil-L-cystein-NaOH módszerrel kezeltük elő. A kezdő NaOH koncentráció 4% volt. Előkezelés után a minta üledékéből Ziehl-Neelsen (ZN) szerint festett kenetet készítettünk. A fennmaradó üledéket 1,5ml foszfát pufferben (pH 6.8) szuszpendáltuk fel (1).

Tenyésztés

Inokulálás előtt a BacTec MGIT 960 és BacTec 12B tenyésztő palackokat a gyártó által leírt módon előkészítettük. A palackokat 0,5ml és a 2db Löwenstein-Jensen (LJ) táptalajt 0,2ml előkezelt mintával inokuláltuk. Az inokulált táptalajokat 37°C-on inkubáltuk. Az inokulált BacTec MGIT 960 palackokat a gyártó utasítása alapján BacTec MGIT nem váltak, de legtovább 6 hétig. A BacTec 12B palackokat az első két hétben heti két alkalommal, majd az elkövetkező 4 héten heti egy alkalommal olvastuk le. Amennyiben a növekedési index (GI) elérte a $GI \geq 10$ értéket, a palackot naponta olvastuk le, míg el nem érte a $GI \geq 100$ értéket és pozitívnak nyilvánítottuk azt. Amennyiben 6 hét után sem volt mérhető $^{14}\text{CO}_2$ képződés, a palackot negatívnak minősítettük. A LJ tenyészeteket heti 1 alkalommal olvastuk le 8 hétig, vagy a látható telepek megjelenéséig. A pozitívnak minősített tenyészetek esetében a párhuzamos tenyészeteket naponta olvastuk le. A pozitivitás

észlelésének napján a tenyészetekről ZN szerint festett kenetet készítettünk a saválló pálcák jelenlétének igazolására, valamint szélesztettük 5% birkavért tartalmazó Columbia agarra (bioMerieux Microbiology Systems, Marcy l'Etoile, Franciaország) az esetleges kontamináció kizárása céljából. A ZN szerint festődő tenyészeteket klasszikus biokémiai tesztekkel és az "AccuProbe culture identification test"-tel (Gen-Probe, San Diego, Calif.) identifikáltuk a gyártó útmutatásai szerint (1).

Statisztika

A tenyésztési módszerek hatékonysága közötti szignifikáns különbségeket a χ^2 próbával állapítottuk meg. A tenyésztési idők közötti eltérések szignifikanciáját az ANOVA (variancia analízis) és a Newman-Keuls módszerekkel határoztuk meg (1).

3.2. Az *rpoB* gén mutáció-analízise PCR-alapú DNS reverzhibridizációval és szekvenálással

Törzsek

Kelet-Magyarországon (Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar és Szabolcs-Szatmár-Bereg Megye) 1999-ben izolált 29 rifampicin–rezisztens törzset vizsgáltunk meg. Pozitív kontrollnak a H37Rv ATCC 27294 törzset és 6 klinikai izolátumot használtunk, melyek mind a 4 első-vonalbéli antituberkulotikumra érzékenyek voltak. Minden egyes izolátumot az „AccuProbe culture identification test”-tel (Gen-Probe Inc., San Diego, Calif.) a gyártó útmutatásai szerint és a hagyományos biokémiai tesztekkel identifikáltuk. Mind a 36 törzs (H37Rv, 6 kontroll izolátum, 29 RMP- rezisztens izolátum) isoniaziddal (INH), rifampicinnel (RMP), ethambutollal (EMB) és streptomycinnel (SM) szembeni érzékenységét a Canetti által leírt proporciós módszerrel végeztük LJ táptalajon. Az alkalmazott kritikus koncentrációk INH 0.2, RMP 40, EMB 1.0 és SM 10 µg/ml voltak.

A vizsgált 29 RMP rezisztens törzs közül csak 2 (6,9%) volt RMP monorezisztens, 1 (3,4%) RMP + SM rezisztens, 26 (89,7%) törzs volt legalább RMP + INH rezisztens, azaz multidrog rezisztens. A 26 MDR törzs közül 12 (46,2%) törzs volt INH + RMP + EMB rezisztens, 2 (3,8%) törzs INH + RMP + SM rezisztens, valamint 7 (26,9%) törzs volt INH + RMP + EMB + SM rezisztens is. Összességében, a 29 törzsből 21 (72,4%) volt rezisztens egyszerre 3 vagy 4 antituberkulotikumra a 4 első-vonalbéli antituberkulotikumok közül (2).

PCR-alapú reverzhibridizáció és szekvenálás

A GI₉₉₉-es növekedési index detektálásának napján az érzékeny kontrollok és az RMP-rezisztens izolátumok BacTec 12B tenyészeteknek 200µl-ét 80°C-on inkubáltuk 1 órán keresztül, a mycobacteriumok előlése céljából. Az *rpo95* és *rpo397* primerek segítségével, melyek az *rpoB* 81bp régióját fogják közre, egy 329bp terméket állítottunk elő a 36 izolátumból. Az amplifikációt Perkin-Elmer 480 programozható hőblokkban végeztük (2).

Ugyanezekkel a primerekkel végeztük mindkét szál DNS szekvencia analízisét, automata Applied Biosystems 377 DNS szekvenáló segítségével (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Az N-terminális régióban található V146F mutáció kimutatására a Tb176-f és Tb176-r primerekkel végeztük el az amplifikációt és szekvenálást, a korábban leírtaknak megfelelően. Így, egy 365-bp terméket állítottunk elő és szekvenáltunk meg ugyanezekkel a primerekkel. Az amplifikációt Perkin-Elmer 480 programozható hőblokkban végeztük (2).

Az Inno-LiPA Rif.TB kittel (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium), a gyártó utasításainak megfelelően (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) egy biotinnal jelölt 256 bp *rpoB* gén fragmentumot is előállítottunk a hővel előlt mintákból. A biotinnal jelölt PCR

terméket, a denaturálást követően, 10 specifikus oligonukleotid próbával hibridizáltuk (19-23 bázis hosszú). A hibridizált PCR produktumok detektálását követően a LiPA vizsgálat eredményeit az irodalomban már korábban publikált módon értékeltük (2).

3.3. Magyarországi rezisztens *Mycobacterium tuberculosis* törzsek molekuláris epidemiológiája

Törzsek

A 68 törzs Magyarország különböző területeiről származott és az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézetben határozták meg a rezisztenciaspektrumukat. Mind a 68 rezisztens *M. tuberculosis* törzset 2003-2004-ben izolálták. Ez a 68 törzs a 2003-2004 években Magyarországon izolált rezisztens törzsek 44,2%-át jelentette. A vizsgált betegek hagyományos epidemiológiai adatait a Nemzeti Tuberkulózis Surveillance Központ adatbázisából nyertük. Mind a 68 izolátum INH, RMP, EMB és SM szembeni érzékenységét a Canetti által leírt proporciós módszerrel határoztuk meg LJ táptalajon (3).

Spoligotipizálás

A mycobacteriális DNS kinyerését és a spoligotipizálást, a kereskedelmi forgalomban kapható teszttel (Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands) végeztük el, a gyártó útmutatása alapján. A spoligotipizálással kapott eredményeinket a nemzetközi SpolDB4 Accses-alapú (Microsoft) információs rendszerrel értékeltük ki (3).

Az IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) fingerprint

Az IS6110 (RFLP) ujjlenyomat vizsgálatot a korábban már publikált standardizált protokoll alapján végeztük el. Az IS6110 RFLP ujjlenyomat mintázatait a Bionumerics software version 3.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) programmal értékeltük ki. Az azonos IS6110 RFLP mintázatot adó *M. tuberculosis* törzseket (azonos helyen lévő [tolerancia 1.3%] és azonos számú IS6110-es sáv) ú.n. cluster-ként definiáltuk. A cluster-be sorolt és a cluster-be nem sorolható betegek demográfiai, járványügyi és rezisztencia adatai között fennálló különbségek igazolására a chi-négyzet (χ^2)- és a Mann-Whitney U próbát alkalmaztuk. A $p < 0.05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A törzsek rokonsági fokának ábrázolására a DICE együttható és az UPGMA módszer alkalmazásával készített dendrogramot alkalmaztuk (3).

3.4. Új *Mycobacterium tuberculosis* törzs azonosítása budapesti hajléktalanokban

Törzsek

A hagyományos epidemiológiai adatokat a Nemzeti Tuberkulózis Surveillance Rendszerből nyertük. Összesen 66 *M. tuberculosis* törzset vizsgáltunk meg, amelyek 2002-ben, az Országos Korányi Tbc- és Pulmonológiai Intézetben újonnan diagnosztizált 66 pulmonális tbc-ben szenvedő hajléktalantól származtak. A 66 eset a 2002-ben regisztrált budapesti hajléktalan tbc-s betegek 47,1%-át reprezentálta. Minden törzset *M. tuberculosis* komplex szinten az AccuProbe identifikáló teszttel (Gen-Probe Inc., San Diego, California) és klasszikus biokémiai reakciókkal identifikáltuk (4).

Spoligotipizálás

A mycobacteriális DNS kinyerését és a spoligotipizálást kereskedelmi forgalomban kapható teszttel (Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands) végeztük a gyártó útmutatása alapján. Spoligotipizálási eredményeinket a nemzetközi SpolDB4 Microsoft Access alapú információs rendszerrel értékeltük ki (4).

Az IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) fingerprint

Az IS6110 RFLP ujjlenyomat-vizsgálatot a korábban már publikált standardizált protokoll alapján végeztük el. Az IS6110-RFLP ujjlenyomat mintázatait a Bionumerics software version 3.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) programmal értékeltük ki. Az azonos IS6110-RFLP-mintázatot adó *M. tuberculosis* törzseket (azonos helyen lévő [tolerancia 1.3%], és azonos számú IS6110-es sáv) úgynevezett cluster-ként definiáltuk (4).

A Mycobacterial Interspred Repetitive Units (MIRU) tipizálás

A MIRU tipizálást a szakirodalomban már korábban leírtak alapján végeztük el. A MIRU egy PCR alapú tipizáló módszer, amelynek segítségével meghatározható a *M. tuberculosis* 12 független, polimorfizmust mutató locus-ban (MIRU-k) található tandem ismétlődéseinek száma. A MIRU típust ennek megfelelően egy 12 jegyű kód adja, amely az egy-egy locus-ban jelen lévő tandem ismétlődések számát mutatja (4).

A *katG*-*gyrA* polimorfizmus vizsgálat

A *M. tuberculosis* törzsek besorolását *katG*-*gyrA* polimorfizmus alapján a Sreevatsan és munkatársai által leírt csoportosítás szerint végeztük el. A vizsgálatot az Applied Biosystem 7000 RealTime PCR rendszerrel (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) végeztük el (4).

4. Eredmények

4.1. A BacTec MGIT 960, a BacTec 12B és a Löwenstein-Jensen tenyésztési módszerek összehasonlítása

Összesen 57 (15,1%) tenyészet volt *Mycobacterium* növekedés pozitív, melyből 14 (24,6%) volt ZN szerint megfestve mikroszkóposan is pozitív és 43 (75,4%) mikroszkóposan negatív. A tenyészetekből 3 species-t, *M. tuberculosis* (n=55), *M. avium complex* (n=1) és *M. xenopi* (n=1) azonosítottunk. Az egyes táptalaj típusok érzékenységre, a következő chi négyzet teszt eredményeket kaptuk: BacTec MGIT 960 versus LJ táptalaj: $p < 0,05$ (szignifikáns), BacTec 12B versus LJ táptalaj: $p < 0,05$ (szignifikáns) és BacTec MGIT 960 versus BacTec 12B: $P > 0,05$ (nem szignifikáns). Az átlagos tenyésztési idők közötti különbségeket a *mycobacteriumokra* és a *M. tuberculosis*-ra vonatkoztatva a Newman-Keuls tesztel vizsgáltuk. A kapott eredmények: BacTec MGIT 960 versus LJ táptalaj: $p < 0,001$ (szignifikáns), BacTec 12B versus LJ táptalaj: $p < 0,001$ (szignifikáns) és BacTec MGIT 960 versus BacTec 12B: $P > 0,001$ (nem szignifikáns) (1).

4.2. Az *rpoB* gén mutáció-analízise PCR-alapú DNS reverzhibridizációval és szekvenálással

A Kelet-magyarországi izolátumokban 11 (37,95%) esetben a kevésbé gyakori D516V mutáció volt kimutatható. Kilenc izolátumban (31,05%) az S531L mutációt, míg kettőben (6,95%) a H526D mutációt mutattuk ki. Ezeket a mutációkat a LiPA tesztel is észlelni tudtuk. A 29 RMP rezisztens izolátumból csupán két (6,95%) olyan törzs volt, amely csak RMP-re mutatott rezisztenciát. Huszonhat (89,7%) törzs a RMP rezisztencia mellett INH-ra is, 18 (62,1%) EMB-ra is, és 9 (31,0%) SM-re is rezisztens volt. A vizsgált 29 törzsből összesen 20 olyan izolátum volt (70,0%),

amely legalább három elsővonalbeli szerre rezisztens volt. A DNS szekvenálás során egy eddig nem közölt kettős mutációt (S509T-D516V), valamint egy deléciót (522-525 deléció) is kimutattunk. Ebben a két esetben a LiPA nem mutatta ki a mutáció pontos típusát, ugyanakkor jelezte a genetikai eltérés jelenlétét. A LiPA teszt két további törzs esetében sem azonosította a ritka mutáció-típusok két fajtáját Q513K és Q513P. Ráadásul a teszt ál-rezisztens eredményt adott az egyik teljesen érzékeny kontroll törzs néma mutációjával kapcsolatban (R529R) (2).

4.3. Magyarországi rezisztens *Mycobacterium tuberculosis* törzsek molekuláris epidemiológiája

A DICE egyíthető és az UPGMA módszer eredményei szerint 35 izolátum (45,6%) mutatott egyedi IS6110 RFLP-fingerprint mintázatot, továbbá 37 izolátum (54,4%) IS6110 RFLP-fingerprint-vagy spoligotíping mintázata azonos volt legalább egy másik izolátumával és ezek 12 különböző cluster-be voltak sorolhatóak. A legnagyobb cluster- be 11 törzs (16,2%), a 4 kisebb, egyenként 3 tagú cluster-be 12 törzs (17,6%) és a 7, egyenként 2 tagú cluster-be 14 törzs (20,6%) volt sorolható. A spoligotípezéssel kapott mintázatok vizsgálatával megállapítható, hogy 45 törzs (66,2%) a Haarlem és 2 törzs a Kelet-Afrikai - Indiai (EAI) genotípushoz tartozott. Továbbá, 21 törzs (30,9%) nem volt besorolható egyetlen nagyobb genotípusba sem. Nem várt, és egyben fontos eredmény, hogy a vizsgált törzsek egyike sem tartozott a Beijing genotípusba. A 68 rezisztens *M. tuberculosis*-sal fertőzött HIV-negatív beteg demográfiai-, szociális- és klinikai adatainak, valamint a rizikótényezők elemzése, semmilyen statisztikailag szignifikáns összefüggést nem mutatott a cluster-be sorolt és cluster-be nem sorolható betegek között. Figyelemre méltó, hogy 21 MDR *M. tuberculosis* törzset be lehetett sorolni valamelyik cluster-be. A cluster-be sorolható és a nem besorolható törzsek rezisztencia-

viszonyai statisztikailag szignifikáns eltérést mutattak SM monorezisztencia és az MDR *M. tuberculosis* esetében. Továbbá, számos cluster esetében az IS6110 RFLP-fingerprint és a rezisztencia-viszonyok között szoros összefüggés volt megfigyelhető (3).

4.4. Új *Mycobacterium tuberculosis* törzs azonosítása budapesti hajléktalanokban

Spoligotipizálás

A vizsgált populációt (61 férfi: 92,4% és 5 nő: 7,6%) HIV-negatív, Magyarországon született egyének alkották. A betegek átlagéletkora 47,8 év (férfiak: 48,2 év; nők: 44,4 év), míg az életkortartomány 31 és 73 év között volt. A spoligotípus-mintázatokat a nemzetközi SpolDB4 adatbázisban található mintázatokkal vetettük össze. A vizsgált törzsek 78%-át, azaz 51 törzset 7 darab, azonos spoligotípust mutató csoportba tudtuk besorolni (ST = shared type; ST50 [n=17] ST1773 [n=12], ST53 [n=8], ST52 [n=6], ST49 [n=4], ST62 [n=3], ST1771 [n=3]) és 15 törzs egyedi spoligotípus-képet mutatott, azaz nem volt csoportba sorolható. Egy törzs sem tartozott a világszerte elterjedt Beijing- típusba. Vizsgálataink mindemellett azt is igazolták, hogy a 7 azonos spoligotípusú csoport egyikébe, az ST1773 jelzésű csoportba tartozó törzsek olyan jellegzetesen egyedi spoligotípus-mintázattal rendelkeznek, ami egy geospecifikus, helyileg kifejlődött és szelektálódott törzs jelenlétét feltételezte. A SpolDB4 adatbázissal összevetve azt találtuk, hogy a törzsek mintázata csak egy spacer különbséget mutat az ST370 jelzésű törzscsoportba tartozó 5 törzshöz képest, amelyeket Ausztriában, Svédországban, Észtországban és az USA-ban izoláltak, valamint közeli rokonságot mutat az ST65 jelzésű törzscsoporttal, amelyet először Ausztriában írtak le, és potenciális őse lehet a budapesti ST1773 törzscsoportnak (4).

Az IS6110 restriction fragment length polymorphism (RFLP) fingerprint

Az IS6110-RFLP-ujjlenyomat alapján 47 izolátum (71,2%) összesen 11, egyenként azonos DNS-ujjlenyomatot mutató törzscsoportba volt sorolható. Az ST1773 spoligotípus-csoportba tartozó 12 törzs közül 11 az RFLP-fingerprint szerint is azonos törzscsoportba (11. törzscsoport) tartozott. A 12. törzs egyedi IS6110 DNS-ujjlenyomatképet mutatott, amely azonban érdekes módon csak egy IS6110 sáv eltérést mutatott a másik 11 törzshöz képest (4).

A Mycobacterial Interspred Repetitive Units (MIRU) tipizálás

A helyi eredet további bizonyítása érdekében a 12 törzsen (ST1773) elvégeztük az ún. MIRU-genotipizálást is, amely mind a spoligotipizáláshoz, mind az IS6110 DNS-ujjlenyomat vizsgálathoz képest érzékenyebb, ezért alkalmas a genom finom eltéréseinek kimutatására. Így, ez a módszer különbséget tud tenni két törzs között, amennyiben azok valóban eltérő genotípusúak. A vizsgált 12 törzs esetében a kapott MIRU-mintázat (224325143322) azonos volt (4).

A *katG*-*gyrA* polimorfizmus vizsgálat

A *katG* 463-as és *gyrA* 95-ös codon-polimorfizmus-vizsgálattal megállapítottuk, hogy mind a 12 törzs a Sreevatsan-féle, úgynevezett 2- es principális genetikai csoportba tartozik, ami arra utal, hogy ez a klón az *M. tuberculosis* filogenetikai törzsfájának alsóbb, azaz ősibb részén helyezkedik el (4).

5. Következtetések

5.1. A BacTec MGIT 960, a BacTec 12B és a Löwenstein-Jensen tenyésztési módszerek összehasonlítása

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a fél-automata BacTec 12B (BacTec 460 leolvasó rendszerrel) és az automata BacTec MGIT 960 folyékony alapú tenyésztési módszerekkel (Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md., U.S.A.) a tenyésztési idő majdnem a felére csökkenthető a LJ táptalajéhoz képest, valamint a szenzitivitásuk is lényegesen magasabb. A nemzetközileg is elfogadott "gold-standard" (1 db folyékony + 2 db szilárd táptalaj) alkalmazása esetén a tenyésztés szenzitivitása még tovább is növelhető. A BacTec 12B rendszerrel ellentétben BacTec MGIT 960 módszer nem radiometriás, nincs szükség injekciós tűkre a minta leoltásához, ezáltal kevésbé balesetveszélyes is. A BacTec MGIT 960 a teljes automatizáltság miatt kevesebb laboratóriumi munkát igényel. Mivel a BacTec MGIT 960 kapacitása jelentősen nagyobb, mint a hasonlóan automatizált ESP II vagy MB/BacT rendszereké, ezért használata jelentősen megkönnyíti és felgyorsítja a napi munkamenetet azon laboratóriumok számára, ahol különösen magas a naponta tenyésztésre érkező minták száma. Ezért, indokoltnak tartjuk a folyékony alapú tenyésztési módszerek széles körű alkalmazását Magyarországon (1, 5).

5.2. Az *rpoB* gén mutáció-analízise PCR-alapú DNS reverzhibridizációval és szekvenálással

Ahhoz, hogy egy tuberkulózis baktériumtörzs gyógyszer-érzékenységről a hagyományos, ú.n. "gold standard" tenyésztési módszerekkel információhoz jussunk, hosszú idő, akár több hónap is szükséges lehet. Ez az idő a korszerű, molekulárbiológiai módszerek alkalmazásával néhány hétre, napra, esetleg órára rövidíthető.

Ily módon megelőzhető az újabb rezisztens baktériumok kialakulása és a különösen veszélyes MDR/XDR *M. tuberculosis* törzsek terjedése. A már kialakult MDR esetek gyors azonosításában, az ebben a helyzetben adható hatásos gyógyszer-kombináció kiválasztásában a molekuláris biológiai módszereknek ugyancsak meghatározó szerepük van. Ennek ellenére szükség van az RMP rezisztencia *in vitro* megállapítására is, valamint a diszkrepáns eredmények esetében pedig a DNS szekvenálásra is. Ugyanis, eredményeink alapján megállapítható, hogy az olyan földrajzi területeken, mint amilyen Kelet-Magyarország is, ahol az *rpoB* gén gyakorinak tartott mutációi ritkábban fordulnak elő, vagy ellenkezőleg, az új mutáció típusok nagyobb arányban vannak jelen, a LiPA teszt eredményének értékelése bonyolultabb és komoly körütekintést igényel. Ilyen területeken elengedhetetlen a mutáció pontos típusának (és a következményes aminosav cserének) DNS szekvenálással való azonosítása. Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a kelet-magyarországi RMP-rezisztens *M. tuberculosis* törzsek mutációinak gyakorisága különbözik az egyéb földrajzi területekről származó törzsek mutációinak gyakoriságától (2).

A fentiek mellett a molekuláris rezisztencia vizsgálat fontos epidemiológiai információkat is hordozhat. Az általunk vizsgált három megyében ugyanis olyan, egyéb földrajzi területeken igen ritkán előforduló vagy más betegcsoportban korábban még nem észlelt RMP mutációk fordultak elő nagyobb gyakorisággal, ami azt jelzi, hogy a RMP illetve MDR rezisztencia kialakulása nem a transzmisszió, azaz rezisztens beteg okozta átfertőzés eredménye, hanem a megbetegedések a nem megfelelő kezelés vagy nem megfelelő gyógyszeresedés eredményeképp jelentkező helyi szelekció eredménye (2).

5.3. Magyarországi rezisztens *Mycobacterium tuberculosis* törzsek molekuláris epidemiológiája

Magyarországon ez az első olyan molekuláris epidemiológiai vizsgálat, amely betekintést nyújt a rezisztens *M. tuberculosis* törzsek genetikai polimorfizmusába és azok transzmissziós dinamikájába. Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgálat törzsek diverzitása fordítottan arányos az incidenciával. Ez arra enged következtetni, hogy a jelenleg rendelkezésre álló, hagyományos epidemiológiai módszerekkel nyert adatok alapján, a rezisztens *M. tuberculosis* törzsek által okozott megbetegedések számát a valóságosnál alacsonyabbnak becsülték meg. Ezt alátámasztják a magyarországi adatok is, miszerint a bakteriológiailag igazolt esetek aránya nem éri el az 50%-ot, továbbá a szükséges rezisztencia-vizsgálatokat csak az esetek 76%-ban végezték el 2009-ben (3, 5).

A cluster-be sorolható törzsek magas aránya, valamint az új fertőzöttek magas aránya (81,1%) a cluster-be soroltak között arra enged következtetni, hogy a rezisztens *M. tuberkulózis* esetek jelentős hányada a jelenben is zajló transzmisszió eredménye. Az a tény, hogy a rezisztens tuberkulózis esetek jelentős hányada a jelenben is zajló transzmisszió eredménye, arra utal, hogy Magyarországon nem működik megfelelő hatékonysággal a rezisztens tuberkulózis esetek monitorozása és kontrollja (3).

5.4. Új *Mycobacterium tuberculosis* törzs azonosítása budapesti hajléktalanokban

Budapesten a tuberkulózis terjedésében a két legfontosabb rizikótényező a hajléktalanság és az alkoholizmus. A hajléktalanok esetében, ritka kivételtől eltekintve, az alkoholizmus is jelen van. Vizsgálataink során megállapítást nyert, hogy a vizsgált budapesti tbc-s hajléktalanok esetében a transzmissziós gyakoriság nagyon magas (71,2%). Így, a hajléktalanok kiváló közeget jelentenek az

egyes *M. tuberculosis* klónok gyors elterjedéséhez. Eredményink olyan alapot jelentenek, amely a jövőben lehetővé és hatékonyabbá teszi a különböző rizikócsoportokon belül (pl. hajléktalanok) a transzmisszió dinamikájának monitorozását és a transzmissziós utak feltárását. Eredményeink arra is felhívják a figyelmet, hogy a hajléktalanok között a tuberkulózis kontrolljára nagyobb figyelmet kell fordítani, és hogy a megelőzés területén az eddigieknél komolyabb lépésekre van szükség.

6. Irodalomjegyzék

1. Somoskövi Ákos, **Csaba Ködmön**, Ákos Lantos, Zoltán Bártfay, Lilla Tamási, Judith Füzy, Magyar Pál: Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the Automated Bactec MGIT 960 System, the Bactec 460 TB System, and Löwenstein-Jensen medium. Journal of Clinical Microbiology, June 2000, 38:2395-2397.

IF: 3,503

2. Bártfay Zoltán, Ákos Somoskövi, **Csaba Ködmön**, Nóra Szabó, Erzsébet Puskás, Lászlóné Kosztolányi, Eszter Faragó, Judit Mester, Linda M. Parsons and Max Salfinger: Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA Sequencing and the Line Probe Assay. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39:3736-3739.

IF: 3,965

3. **Ködmön Csaba**, Stefan Niemann, Judit Lukács, Eva Beer, Sándor Dávid and Ákos Somoskövi: Molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Hungary. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44:4258-4261.

IF: 3,445

4. **Ködmön Csaba**, Stefan Niemann, M. Cristina Gutierrez, Christophe Sola, Nalin Rastogi, Judith Lukács, Ákos Somoskövi: Molecular clues of a homeless microepidemy among tuberculosis patients in Budapest due to a new and local *Mycobacterium tuberculosis* clade. Infect Genet Evol. 2007, 7:632-5.

IF: 2,407

5. **Ködmön Csaba,** Nóra Szabó, Erzsébet Nagy. A TBC laboratóriumi diagnosztikájának helyzete Magyarországon. *Lege Artis Medicinae*, in press.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Nagy Erzsébetnek a kiváló tudományos és szakmai támogatásért.

Dr. Somoskövi Ákosnak a kiváló tudományos és szakmai segítségért, valamint kutatómunkám odaadó támogatásáért.

Továbbá, köszönettel tartozom a szakmai és technikai segítségért:

Prof. Magyar Pál egyetemi tanárnak,

Prof. Hutás Imre egyetemi tanárnak,

Dr. Bártfai Zoltán egyetemi adjunktusnak,

Prof. Max Salfinger egyetemi tanárnak,

Dr. Linda M. Parsons biológusnak,

Dr. Stefan Niemann biológusnak,

Szilágyi Zsuzsanna asszisztensnek,

Gulyás Katalin asszisztensnek és

Dombai Ágnes asszisztensnek.