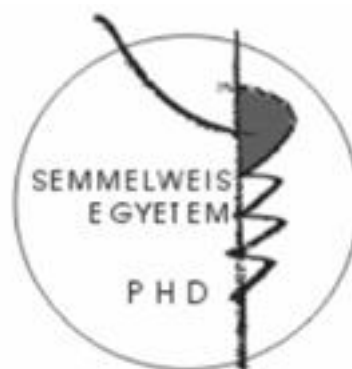


Streptococcus pneumoniae hordozás epidemiológiai vizsgálata közösségbe járó egészséges gyerekek között

Doktori tézisek

Tóthpál Adrienn

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dobay Orsolya, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Mészner Zsófia, főigazgató, MD, Ph.D.
Dr. Ludwig Endre, egyetemi tanár MD, D.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Bagdy György, egyetemi tanár,
MTA doktora D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Emőd Levente, professzor emeritus MD,
D.Sc.
Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár,
MD, D.Sc.

Budapest
2014

Bevezetés

A *Streptococcus pneumoniae* – más néven pneumococcus – gyakran okoz kórképeket gyerekekben és felnőttekben egyaránt. A WHO szerint ez a baktérium évente közel egy millió gyerek haláláért felelős, pneumónia vagy invazív kórképek (IPD) következtében, mint például a meningitis és bacteriemia. Szintén jelentős kórokozó egyéb légúti kórképekben, mint az otitis media és sinusitis. Bár pneumococcus okozta fertőzés minden korosztályt érinthet, mégis a leginkább veszélyeztetettek a 2 évesnél fiatalabbak és a 65 évnél idősebbek. A baktérium maga gyakran megtalálható az orrgaratban, különösen kisgyerekkorban. Ezek a tünetmentes baktériumhordozók később további fertőzés forrásaként szolgálhatnak a közösségben.

A baktérium poliszacharid tokja a legfőbb virulencia faktora, ami az immunrendszer inaktivációjában játszik szerepet. Eddig 94 különböző tok poliszacharid változatot - más néven tokantigént - ismerünk, amit specifikus ellenanyagok segítségével tudunk elkülöníteni, ezért hívjuk szerotípusnak. A penicillin és származékai tartoznak a leggyakrabban használatos antibiotikumok közé a pneumococcus okozta kórképekben. Sajnos ezek az antibiotikumok sem mindig hatékonyak, mivel világszerte megjelentek penicillinre nem-érzékeny törzsek, ezért a kezelés néha nehezzé és költségessé válik.

A betegségek elkerülésének legmegbízhatóbb módja a megelőző védőoltás. Magyarországon két különböző típusú oltóanyag van forgalomban. Az egyikben csak tisztított tokantigén található, a másikban ez a tokantigén a T-sejtes immunválasz kiváltása érdekében fehérje hordozóhoz van kötve (konjugált oltás, PCV). A csak tokantigént tartalmazó oltás a Pneumovax 23, ami 23 db különböző tisztított tokantigént tartalmaz, és 5 éves kor fölött ajánlott. A konjugált oltások közül ma a PCV10 (Synflorix) és a legújabb PCV13 (Prevenar 13) érhető el. A PCV13 a PCV7 továbbfejlesztett változata, ami hét tokantigént (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) tartalmazott. Amikor ezt az oltást 2000-ben kifejlesztették, ezek a szerotípusok voltak felelősek a kórképek döntő többségéért. A PCV7 oltást 2003 és 2009 között vezették be Európa országaiban a különböző Nemzeti Immunizációs Programok (NIP) keretein belül. Magyarországon 2005-től elérhető, de az első 3 évben nagyon alacsony volt az átoltottság, leginkább magas ára miatt. 2008 októberében a Pneumococcus Prevenció Programnak köszönhetően ingyenessé vált a 2 éves kor alattiak számára. Az átoltottság ekkor ugrásszerűen megnőtt (közel 90%-ra) és azóta is tovább nő. 2009 áprilisában

bekerült az ajánlott, de nem kötelező oltások közé, 2+1 oltási rendszerben a 2. 4. és 15. hónapos korban beadva. 2010 szeptemberében a PCV7-et felváltotta a PCV13, ami további 6 tokantigénnel (1, 3, 5, 6A, 7F, and 19A) bővült. 2014. július 1-től a PCV13 bekerült a kötelező védőoltások közé.

Világszerte megfigyelték, hogy a széles körben alkalmazott PCV7 oltás jelentősen lecsökkentette a vakcina szerotípusú pneumococcus törzsek által okozott olykor súlyos kórképek számát oltott gyerekekben és nem oltottakban egyaránt, köszönhetően a nyájimmunitásnak, ezért kedvező közegészségügyi haszna egyértelmű. Ugyanakkor az oltás hatására a pneumococcus szerotípusok megváltoztak. Néhány nem a PCV7-be tartozó szerotípus száma nagymértékben megnőtt mind a hordozók mind az invazív kórképek tekintetében is.

A PCV13 bevezetése szélesebb vakcinalefedést biztosított, és várható volt, hogy az előtérbe került nem vakcina típusok (mint a 19A, és 3-as) számát csökkenti a hordozásban és az invazív kórképekben is. Emellett újfent számítani kellett korábban nem elterjedt, nem PCV13 szerotípusú törzsek gyakoriságának emelkedésével.

Ezért a jelen tanulmány célja volt a közösségbe járó egészséges gyerek által hordozott pneumococcusok epidemiológia felmérése, és az oltások hatására történő szerotípus kicserélődés figyelemmel kísérése, első ízben Magyarországon.

Célkitűzés

- Mintagyűjtés az egészséges óvodába, bölcsődébe járó gyerekektől, mivel ők a pneumococcus okozta fertőzés legfontosabb forrásai.
- Hordozási arány, és egyéb hordozást befolyásoló tényezők feltárása, mint pl. a nem, a kor, testvérek száma, oltottsági állapot, korábban tapasztalt visszatérő otitis media.
- A hordozott törzsek szerotípusának, antibiotikum érzékenységének, genetikai diverzitásának, klonalitásának meghatározása.
- Az oltás hatására történő szerotípus kicserélődés felmérése, mind a PCV7 mind a PCV13 oltást követően, összehasonlítása a nem oltott csoportokkal.
- Törzseink összehasonlítása nemzetközileg elterjedt pneumococcus klónokkal, rokonsági viszonyuk feltárása
- Annak megállapítása, hogy mely szerotípusok válhatnak gyakorivá PCV13 oltást követően, ezáltal megjósolva, mely típusok megjelenése várható majd invazív kórképekben is.

Módszerek

Vizsgált csoport

Összesen 2485 gyerektől származó orrmintát gyűjtöttünk be 2009 márciusa és 2013 áprilisa között. A gyerekek 15 különböző magyarországi település 48 óvodájába vagy bölcsődéjébe jártak a gyűjtés alatt. A szülőktől beleegyező nyilatkozatot és a gyerekre vonatkozó általános információkat kértünk.

Mintagyűjtés és a törzsek meghatározása

Steril mintavevő pálcával (Transwab, Medical Wire & Equipment, UK) mindkét orrlyukból mintát vettünk, és pár órán belül a laborba szállítottuk. Ezt követően 5%-os véres agarra szélesztettük és egy éjszakán át tenyésztettük őket 37°C-on 5%-os CO₂ termosztátban. A pneumococcushoz hasonló telepeket (α -hemolízis, köldökös telepmorfológia) továbboltottuk és vizsgáltuk az optochin érzékenységüket (5 μ g korong, Mast Diagnostica, UK). A törzsek identifikálása a *lytA* (autolysin) gén PCR-es vizsgálatával történt. A kitenyésztett törzseket -80°C-on, speciális fagyasztó gyöngyökön (Mast Diagnostica) tároljuk.

Szerotípus meghatározás

Szerotípus meghatározáshoz a latexagglutinációt (Pneumotest Latex Kit, Statens Serum Institut, Koppenhága, Dánia) használtunk. A faktor meghatározását szerotípus specifikus PCR és Quellung teszt kombinációjával végeztük. A PCR-t zömmel a CDC által javasol primerekből állítottuk össze. Néhány esetben, amikor mi nem tudtuk meghatározni, a törzseket az OEK Nemzeti Pneumococcus Referencia Laboratóriumba, vagy a Német Nemzeti Streptococcus Referencia Laboratóriumba (GNRCS) küldtük további szerotípus meghatározásra.

Genotípus meghatározás

A törzsek rokonsági (klonalitás) viszonyának megállapításához pulzáló mezejű gélelektroforézist (PFGE) használtunk. A teljes baktérium genom, a kinyerést követően *Sma*I restrikciós enzimmel lett emésztve, és a kapott emésztési eredményeket hasonlítottuk egymáshoz. A PFGE dendrogram alapján multi-lókuszos szekvencia tipizálást (MLST) is végeztünk. Ebben az esetben 7 meghatározott háztartási gén (*aroE*,

gdh, gki, recP, spi, xpt, ddl) PCR-el történő felszaporítása, tisztítása és szekvenálása (BIOMI Ltd., Gödöllő) zajlott. Ezek szekvencia eredményét az MLST adatbázisban (<http://spneumoniae.mlst.net/>) található adatokkal összehasonlítva határozható meg a törzsek szekvencia típusa (ST).

Teljes genom szekvenálás

Két törzs teljes genom szekvenálását végeztük el, de eddig csak az MLST adatokat tudtuk feldolgozni.

Antibiotikum érzékenység meghatározása

A törzseket az alábbi antibiotikumokra teszteltük agar hígítási módszerrel, illetve E-teszt segítségével: penicillin, cefotaxim, imipenem, erythromycin, telithromycin, clindamycin, levofloxacin, moxifloxacin és vancomycin. Egy napos inkubálás után a kapott eredményeket az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) által javasolt értékek alapján határoztuk meg.

Makrolid rezisztencia meghatározása

A törzsekben PCR segítségével vizsgáltuk az *ermB*, *ermA*, *ermTR* és *mefA/E* rezisztencia gének jelenlétét. A *mefA* és *mefE* közötti különbséget *BamHI* enzimesséssel tudtuk megállapítani, *mefA* esetében a PCR termék 2 különböző méretű részre emésztődik, *mefE* esetén pedig emésztetlen marad.

Pilus jelenlétének vizsgálata

PCR segítségével határoztuk meg a pilusok jelenlétét a baktériumokban.

Statisztikai elemzés

A statisztikai korrelációt Khi-négyzet próba és Fisher-féle egzakt próba segítségével állapítottuk meg, a különbséget 95%-os konfidenciaszint ($p < 0,05$) érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Hordozási eredmények

A 2485 gyerekből 838-an hordoztak pneumococcut, így a hordozási arány 33,7% volt. Három esetben kettős hordozást figyeltünk meg. A hordozókat 3 csoportra osztottuk az alapján, hogy mikor zajlott a mintagyűjtés és mekkora volt az adott csoportban az átlagos átoltottság. Az alacsony szinten átoltott csoportba (GR1) tartoztak a 2010 októbere előtt vizsgált óvodások, ebben a csoportban az átlagos átoltottság PCV7-tel 14,0% volt. A PCV7-el magasan átoltott csoportba (GR2) a 2010. októbertől 2012. júniusig leszűrt óvodások tartoztak. Itt az átoltottság már 44,0%-os volt. A harmadik csoportba (GR3) azok a bölcsődés gyerek tartoztak, akiket 2013. március és április során vizsgáltuk. Ezek a gyerekek már az új PCV13 oltást kapták és az átoltottság 84,5% volt.

Hordozási adatok (GR1)

Az első csoportban összesen 631 orrváladékot gyűjtöttünk. Ebből 216 pneumococcus izolátumot találtunk, így a hordozási arány 34,2%-os lett.

Hordozási adatok (GR2)

A második csoportban 1627 orrváladékból 528 esetben találtunk pneumococcut, így a hordozási arány 32,5%-os lett.

Hordozási adatok (GR3)

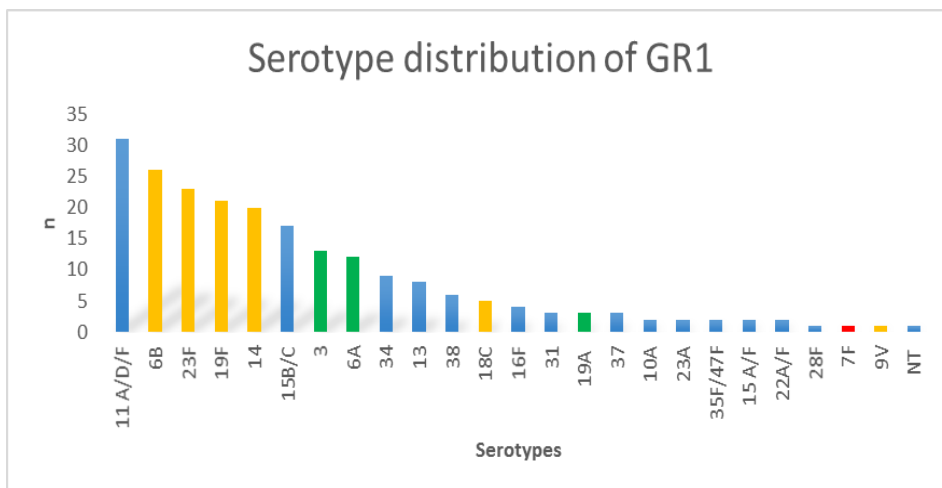
A harmadik csoportban összesen 227 mintát gyűjtöttünk és 94 hordozott pneumococcut találtunk, a hordozási arány tehát 41,4% volt.

Szerotípus megoszlás

Mivel az oltások jelentősen befolyásolják a szerotípusok megoszlását, ezért az eredmények kiértékelésében ezt fontos volt figyelembe venni. A GR1 csoportban alacsony az átoltottság PCV7-el, GR2 csoportban már jóval magasabb, a GR3 csoport pedig már magasan átoltott PCV13-al.

Szerotípus megoszlás a GR1-ben

A 218 izolált pneumococcusból 14,2% (n=31) a 11A/D/F szerotípusba tartozott. Ezt követték a régen jellemzően domináns ún. 'pediatrikus' szerotípusok, a 6B (n=25), 23F (n=22), 19F (n=21), 14 (n=20), amelyek mind PCV7 vakcina típusok (**1. ábra**).

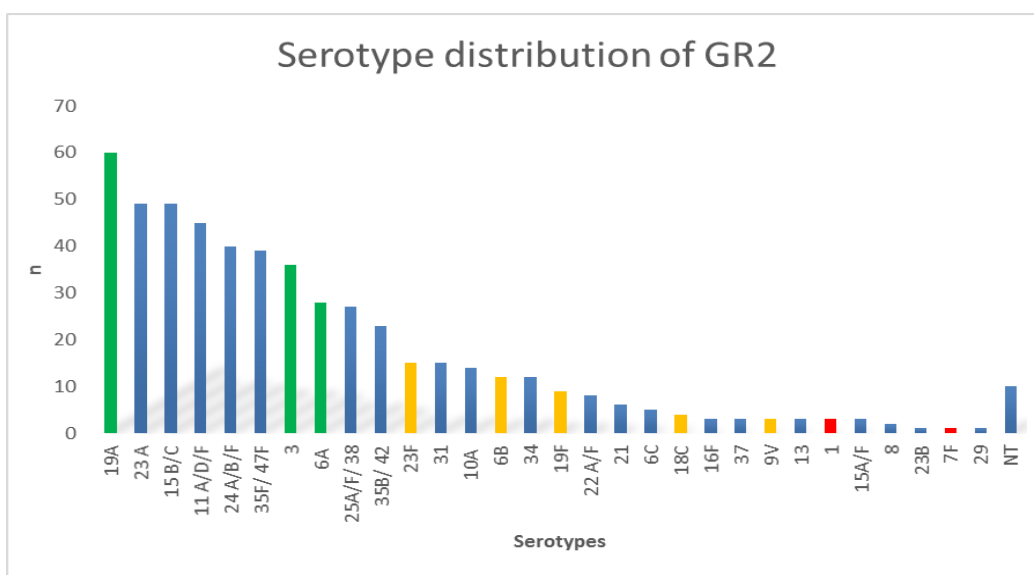


1. ábra. Sárga oszlop: PCV7 szerotípusok, piros oszlop: további szerotípusok a PCV10-ben, zöld oszlop: további szerotípusok a PCV13-ban, kék oszlop: nem-PCV7 szerotípusok, NT: nem tipizálható, n= izolátumok száma

Az oltás lefedettsége 44,5% volt. Ez azt jelenti, hogy a talált törzsek 44,5%-a lett volna megelőzhető az oltással. Ez az érték PCV10-re 44,9%, PCV13-ra pedig 57,8%.

Szerotípus megoszlás a GR2-ben

Az 529 izolátum leggyakoribb szerotípusai szerint csökkenő sorrendben a következők: 19A (n=60), 23A (n=49), 15B/C (n=49), 11A/D/F (n=45), 24A/B/F (n=40), 35F/47F (n=39), 3 (n=36), 6A (n=28), de összesen 30 különböző szerotípust azonosítottunk (**2. ábra**).

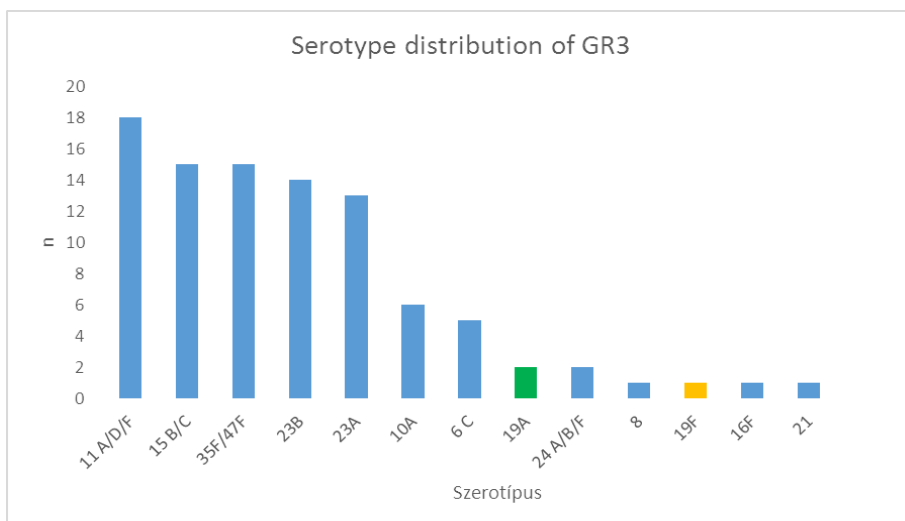


2. ábra. Sárga oszlop: PCV7 szerotípusok, piros oszlop: további szerotípusok a PCV10-ben, zöld oszlop: további szerotípusok a PCV13-ban, kék oszlop: nem-PCV7 szerotípusok, NT: nem tipizálható, n= izolátumok száma

A számított vakcina lefedettség PCV7 esetén 8.1%, PCV10-re 8.9%, míg PCV13 esetén 32.3%-os volt.

Szerotípus megoszlás a GR3-ban

A 94 izolátum szerotípus megoszlása gyakoriság szerint csökkenő sorrendben a következő: 11A/D/F (n=18), 15B/C (n=15), 35F/47F (n=15), 23B (n=14), 23A (n=13), 10A (n=6), 6C (n=5), 19A (n=2), 24 A/B/F (n=2), 8 (n=1), 19F (n=1), 16F (n=1) és 21 (n=1) (**3. ábra**).



3. ábra. Sárga oszlop: PCV7 szerotípusok, zöld oszlop: további szerotípusok a PCV13-ban, kék oszlop: nem-PCV7 szerotípusok, n= izolátumok száma

A PCV7 oltás lefedettsége itt már csupán 1,1%-os, a PCV10-é ugyanennyi, a PCV13-é pedig 3,2%-os volt.

Antibiotikum érzékenység és rezisztencia gének

Antibiotikum érzékenység a GR1-ben

Általánosan elmondható, hogy a vizsgált törzsek érzékenyek bizonyultak, kivéve makrolidokra és clindamycinre, ahol 21,4%-os ill. 14,2%-os rezisztencia arányt tapasztaltunk. Penicillinre, vagy más β -laktámra rezisztens törzset nem találtunk, de a penicillin mérsékelt érzékenység az esetek 24,2%-ban volt megfigyelhető. A rezisztens szerotípusok közé leginkább a PCV7 típusok tartoztak (többnyire 23F, 19F, 6B). A makrolid rezisztens törzsek közül 24 esetben az *ermB* gént találtunk, ami magas makrolid és linkozamid rezisztenciát okoz. Tizenhat esetben *mefE* gént találtunk, ami alacsony rezisztenciát okoz (efflux mechanizmus).

Antibiotikum érzékenység a GR2-ben

Nagyon hasonló eredményeket kaptunk a GR2-be tartozó törzsek kapcsán. Csak egy penicillin rezisztens törzset találtunk, de a baktériumok 21,9%-a volt mérsékelt érzékeny. A törzsek 21,8%-a makrolid rezisztens és 19,0%-uk clindamycin rezisztens. Ezek döntő többsége 19A szerotípusú volt. A makrolid rezisztens törzsek között 91

esetben találtunk *ermB* gént és 16 esetben *mefE* gént. Öt törzsből az *ermB* és *mefE* gének együttes előfordulását találtuk.

Antibiotikum érzékenység a GR3-ban

A átlagos antibiotikum érzékenység ebben a csoportban szintén alacsony volt, kivéve makrolidok esetén, melyre a törzsek 21,3%-a, clindamycinre pedig 17,4%-a rezisztens volt. Nem találtunk penicillin rezisztens törzset, de a mérsékelten érzékenyek aránya itt is 20,7% volt. A rezisztens törzsek nagy többsége a 23A szerotípushoz tartozott. A makrolid rezisztens törzsek között 8 esetben találtuk *ermB* gént és egyetlen *mefE* gént sem.

Pílus eredmények

Pílus eredmények a GR1-ben

A 218 törzsből 25 esetben (11,5%) találtunk pílust. Ezek közül 16 volt mérsékelten érzékeny penicillinre és 14 volt magas szinten makrolid és clindamycin rezisztens.

Pílus eredmények a GR2-ben

Az 529 törzsből 102 esetben (19,3%) találtunk pílust. Ebből 27 esetben a törzsek penicillin mérsékelten érzékenységet, magas makrolid és clindamycin rezisztenciát mutattak. A rezisztens törzsek közül 25 *ermB* pozitív volt és 3 *mefE* pozitív. Szoros összefüggést találtunk a 24 A/B/F szerotípus és a pílus pozitívítás között.

Fontosabb szerotípusok PFGE analízise

Bizonyos szerotípusok rokonsági kapcsolatának feltárása PFGE segítségével történt. A kapott eredményeket a Bionumerics szoftverrel (Bio-Rad) értékeltük ki (Jaccard koefficiens és UPGMA átlag alapján). Az összes szerotípus közül a legfontosabb a 19A szerotípusok PFGE vizsgálata volt, mivel a PCV7 oltást követően ez vált a leggyakoribbá, általánosan rezisztens és invazív kórképekért felelős.

19A szerotípus PFGE eredménye

A kapott eredmények azt mutatták, hogy a törzsek általánosan mind nagyfokú rokonságot mutattak, de további kisebb clustereket figyelhattunk meg (2 nagyobb és egy kisebb csoport). Ezek mind hasonló penicillin érzékenységet mutattak. Mivel ez a szerotípus vált uralkodóvá a GR2 csoportban, továbbá majdnem az összes törzs makrolid rezisztens volt, szeretnénk volna tudni, vajon nem tartozik-e a korábban Magyarországon leírt és világszerte elterjedt klónhoz (PMEN Hungary^{19A}-6). A dendogram alapján a mi törzseink élesen elkülönültek ettől a korábbi PMEN klóntól. A GR3 csoportban talált, összesen 2, 19A törzs PFGE képe nagyon szoros rokonságot mutat a többi GR2-ből származó 19A törzssel.

19F szerotípus PFGE eredménye

19F szerotípus esetében 4 törzsnél sikerült egyezőséget találni egy világszinten elterjedt PMEN törzssel (PMEN-Taiwan^{19F}-14). Ezek a törzsek két különböző óvodából (Szeged, Győr) származtak.

3-as szerotípus PFGE eredménye

3-as szerotípus esetén a talált törzsek teljesen hasonló PFGE képet mutattak 3 különböző óvodában (Miskolc, Szeged, Debrecen), tehát azonos klónról van szó.

További szerotípusok PFGE eredménye

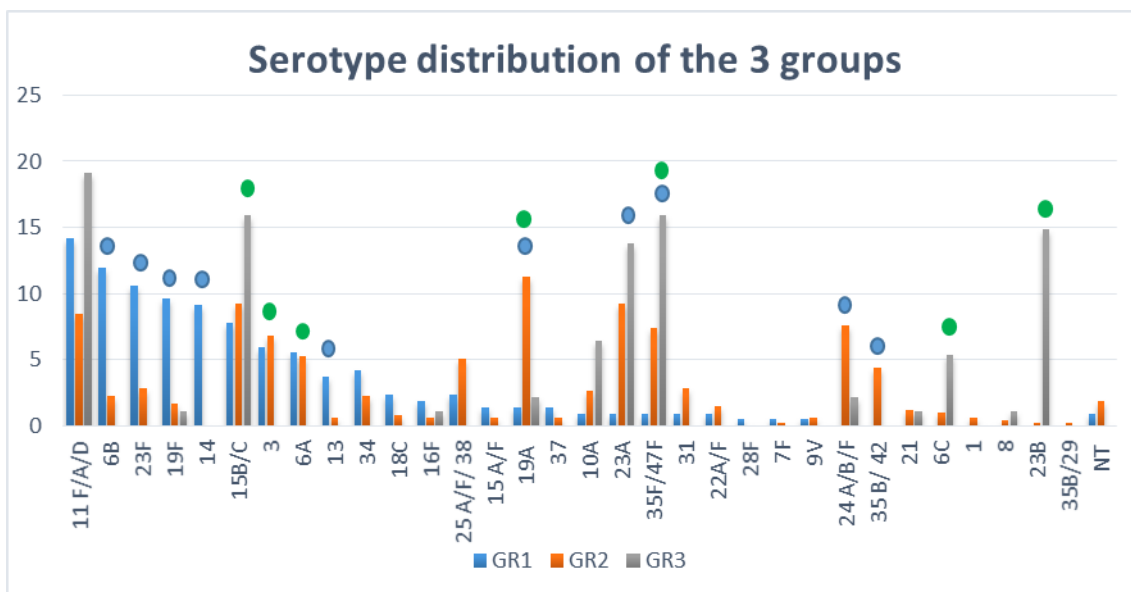
A többi szerotípus esetén (15B/C, 11 A/D/F, 37) az egy óvodán vagy egy csoporton belüli klonális terjedés volt jellemző, különböző óvodák közötti terjedést ritkán találtunk.

MLST eredmények néhány reprezentatív 19A törzs esetében

A PFGE során mutatott kép alapján kiválasztottunk néhány 19A törzset a nagyobb csoportokból további MLST rokonsági vizsgálatra. Négy törzs (mind penicillin érzékeny) ugyanahhoz a szekvencia típushoz (ST) tartozott (ST 8430). Négy penicillinre mérsékelten érzékeny törzs az ST-319-es törzsbe tartozott. További szekvencia típusok egy-egy törzs esetén: ST-97, ST-1611, ST-1757, ST-320, ST-268. Ezek az MLST eredmények jól korreláltak a PFGE során kapott eredményekkel.

Megbeszélés

1. Az átlagos hordozási arány az összes gyerek tekintetében 33,8%-os volt. A 3 különböző csoportban talált arányok (GR1: 34,2%, GR2: 32,5% és GR3: 41,4%) hasonlóak az irodalomban fellelhető arányokkal. Kettős hordozást csak 3 esetben találtunk, ami a tenyésztési módszer kisfokú érzékenységből adódhat.
2. GR1-ben az izolált törzsek nagy része a gyakori gyerekkorban előforduló szerotípusok közé tartozott (6A/B, 14, 19F, 23F, 4. ábra). Ezen törzsek megbetegítő képessége magas, a gyerekekben kialakuló invazív esetek 70-80%-át tették ki világszinten a PCV7 oltást megelőzően. Ezért is ezek a szerotípusok kerültek az oltásba.
3. GR2-ben szembetűnő szerotípus változást figyeltünk meg. Az előző csoportban domináns szerotípusok (pl. 19F, 23F és 6B) szignifikánsan csökkentek, és helyüket új, nem-PCV7 típusú törzsek vették át. A 14-es szerotípus teljesen el is tűnt a PCV7 oltás hatására. Ellenben szignifikánsan megnőtt a 19A és a 23A szerotípusok száma. Sajnos a 19A, amely a leggyakoribbá vált, gyakran multi-rezisztens és súlyos kórképekért felelős. Ezt a növekvő tendenciát a 19A szerotípus kapcsán szinte mindenhol a világban tapasztalták a PCV7 oltást követően (4. ábra).
4. GR3-ban, ahol a gyerekek már PVC13-al lettek oltva, szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a PCV13 típusú törzsek kapcsán. 19A szerotípust, a vezető szerotípus GR2-ben, összesen 2 esetben találtunk, de ez a két törzs a korábbi 19A törzsekkel mutatott szoros rokonságot. Szignifikáns növekedést tapasztaltunk a 15B/C, 35F/47F, 6C és 23B szerotípusok számában. Hasonló megfigyelések történtek más országokban is PCV13 oltást követően mind a hordozásban, mind az invazív esetekben (4. ábra)



4. ábra. Szerotípus megoszlás a GR1, GR2 és GR3 csoportban. Kék kör: szignifikáns eltérést mutat a GR1 és GR2 között a PCV7 oltást követően ($p < 0,05$). Zöld kör: szignifikáns eltérést mutat a GR2 és GR3 között a PCV13 oltást követően ($p < 0,05$).

- A 3 csoport eredményeit összehasonlítva elmondható, hogy az általános antibiotikum érzékenységben nem történt változás, csak a szerotípusok változtak, amelyek a rezisztenciagéneket hordozzák.
- GR1-ben a penicillinre mérsékelten érzékeny törzseket az abban a csoportban gyakori vezető szerotípusok adták (23F, 19F, 6B). GR2-ben, PCV7 oltást követően, a 19A vált gyakorivá, amit a GR3-ban a 23A váltott fel.
- Ugyan ezt figyelhettük meg makrolid rezisztencia esetén. GR1-ben az ott gyakori szerotípusok, GR2-ben a 19A és GR3-ban a 23A volt felelős a makrolid rezisztens törzsek nagy számáért.
- GR1-ben szoros összefüggést találtunk az antibiotikum érzékenység és pílus pozitivitás között. A pílussal rendelkező törzsek 64%-a volt magasan makrolid rezisztens. GR2-ben a 24A/B/F szerotípust találtuk gyakran pílussal rendelkezőnek, bár ez a törzs antibiotikumra érzékeny volt. Viszont a második leggyakoribb pílussal rendelkező szerotípus a 6A volt, és ebben az esetben a törzsek 53%-a makrolid rezisztens volt. Ezek a megfigyelések további vizsgálatokat igényelnek, többek közt azért is, mert több kutatás bizonyította a pílus jelentőségét a DNS transzformáció során.

9. A PFGE mintázatok alapján általánosan megállapítható, hogy az egy óvodából származó hasonló szerotípusok ugyanazok a klónok, vagy egymásnak közeli rokonai, tehát a gyerekek között intenzíven átadódnak a baktériumok egy csoporton belül. Természetesen ez a szoros kapcsolatnak tudható be, ami ezekben a csoportokban a gyerekek között gyakran fennáll.
10. Sok esetben viszont egy szerotípus ugyanazon klónja volt fellelhető különböző város óvodásai között. Például 19F esetén ugyan azt a klónt találtuk Győrben és Szegeden is. Ezek a törzsek ráadásul egy világszerte gyakori klónnal mutattak egyezést (PMEN Taiwan^{19F}-14), ami makrolid rezisztens és penicillin mérsékelten érzékeny, csakúgy, mint a mi törzseink. Ezt a klónt korábban is kimutatták már invazív mintákból Magyarországon.
11. A legfontosabb PFGE vizsgálat a GR2-ben uralkodóvá vált 19A szerotípus kapcsán történt. Azt találtuk, hogy a törzsek valamilyen szinten rokonságban álltak, de még kisebb csoportokra lehetett őket osztani, ahol a penicillin érzékenység is hasonló képet mutatott. Mind az MLST, mind a PFGE eredményekből is látszik, hogy a törzseink nagyon különböztek a korábbi magyar 19A klóntól.
12. A 19A szerotípusok között a legmagasabb penicillin MIC-cel rendelkező törzsek, amik makrolid rezisztensek is egyben és *ermB* + *mefE* génnel rendelkeznek, az ST-320-as MLST klónhoz tartoztak. Ez a klón is híresen multi-rezisztens, világszerte elterjedt.

Következtetés

- PCV oltás hatására drasztikus szerotípus kicserélődés figyelhető meg. A korábbi PCV7 szerotípusok száma ugyan szignifikánsan csökkent, de helyükre más, korábban ritkább szerotípusok léptek.
- A legfontosabb ilyen helyettesítő szerotípus a PCV7 után a 19A, ami általánosan multi-rezisztens, és magas a súlyos kórképeket okozó hajlama, ahogy ezt több országban megfigyelték az invazív esetekben PCV7 oltást követően.
- A PCV13 oltást követően a 19A és egyéb PCV-13 vakcina szerotípusú törzs gyakorisága csökkenő tendenciát mutatott.

- Az általános antibiotikum érzékenység a 3 csoportban nem változott, de mindhárom csoportban különböző szerotípusok voltak felelősek a rezisztenciáért. GR1-ben az ott domináns vakcina típusú törzsek, GR2-ben szinte csak a 19A, és GR3-ban leginkább a 23A.
- A PFGE és MLST adatok alapján megállapítható, hogy a 19A szerotípusú törzsek nem rokonai a korábbi magyar Hungary^{19A}-6 klónnak. Viszont a 19F törzsek között találtunk ilyen világszerte elterjed klónt (PMEN Taiwan^{19F}-14)
- A PFGE hasznos vizsgálat a hordozott törzsek genetikai rokonságának felderítésére egy ilyen kisméretű országban, mint Magyarország. Az eredmények további finomítást nyertek MLST vizsgálattal.
- A PFGE eredmények azt mutatják, hogy a törzsek klonális terjedése, és a rezisztencia gének horizontális átadása együtt vesznek részt a szerotípus kicserélődésben PCV oltásokat követően
- Szoros összefüggés figyelhető meg a pílus pozitívitás és az antibiotikum rezisztencia (penicillin és makrolid) és/vagy bizonyos szerotípusok között (24 A/B/F)
- Mind a PCV7, mind a PCV13 bizonyítottan hatékonyan szünteti meg a vakcina típusú törzsek elterjedését. Ezért javasoljuk a PCV13 oltás folytatását Magyarországon.
- A hozzánk hasonló, mások által megfigyelt eredmények alapján a gyógyszergyáraknak bővíteniük kellene a konjugált oltások tartalmát, vagy átállni egy olyan teljesen más összetételű, teljes sejt, vagy protein alapú oltóanyag gyártására, amely nem szerotípus függő.

Saját közlemények listája

Az értekezés témájában megjelent közlemények

Tóthpál A, Kardos S, Laub K, Nagy K, Tirczka T, van der Linden M, Dobay O. (2014) Radical serotype rearrangement of carried pneumococci in the first 3 years after intensive vaccination started in Hungary. Eur J Pediatr. September 2014, DOI: 10.1007/s00431-014-2408-1 **IF: 1.983**

Tóthpál A, Laub K, Kardos S, Nagy K., Dobay O. (2014) Invazív és hordozott *Streptococcus pneumoniae* izolátumok vakcina lefedettsége Magyarországon. Lege Artis Medicinae, 24:(4) pp. 180-185.

Dobay O., Tóthpál A. (2014) Pneumococcus elleni konjugált védőoltások. *Gyermekorvos Továbbképzés* **13**(3):131-133.

Tóthpál A, Laub K, Kardos S, Nagy K, Dobay O. (2012) Changes in the serotypes of Hungarian pneumococci isolated mainly from invasive infections: a review of all available data between 1988 and 2011. Acta Microbiol Immunol Hung, 59(3): 423-433. **IF: 0.646**

Tóthpál A, Kardos S, Hajdú E, Nagy K, Linden M, Dobay O. (2012) Nasal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among Hungarian children before the wide use of the conjugate vaccine. Acta Microbiol Immunol Hung, 59(1): 107-118. **IF: 0.646**

Tóthpál A, Dobay O. (2012) A hordozott pneumococcusok szerotípusainak drasztikus változása a megnövekedett átoltottság hatására. Orv Hetil, 153(26): 1031-1034.

Tóthpál A, Ordas A, Hajdú E, Kardos S, Nagy E, Nagy K, Dobay O. (2011) A marked shift in the serotypes of pneumococci isolated from healthy children in Szeged, Hungary, over a 6-year period. Acta Microbiol Immunol Hung, 58(3): 239-246. **IF: 0.787**