

## Főbb projektek

### 1) *Invazív pneumococcus populáció komplex epidemiológiai felmérése*

A pneumococcus elleni konjugált vakcina, a *Prevenar* Magyarországon 2005 decemberében került forgalomba, és 2008 októberétől a 2 év alatti gyerekek számára ingyenesen hozzáférhető. Remélhetőleg a jövőben bekerül a kötelező védőoltások közé. Mivel a pneumococcus vakcinákat elsősorban a súlyos betegséget okozó invazív törzsek ellen fejlesztették ki, különösen fontos az invazív pneumococcus populáció felmérése. Az elmúlt évek során (2000-2008) több rutin diagnosztikai laboratóriumból (Semmelweis 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 150 invazív pneumococcus törzset gyűjtöttünk. Ezek komplex epidemiológiai felmérését végeztük el, azaz meghatároztuk az antibiotikum érzékenységüket, szerotípusukat és genetikai összetartozásukat.

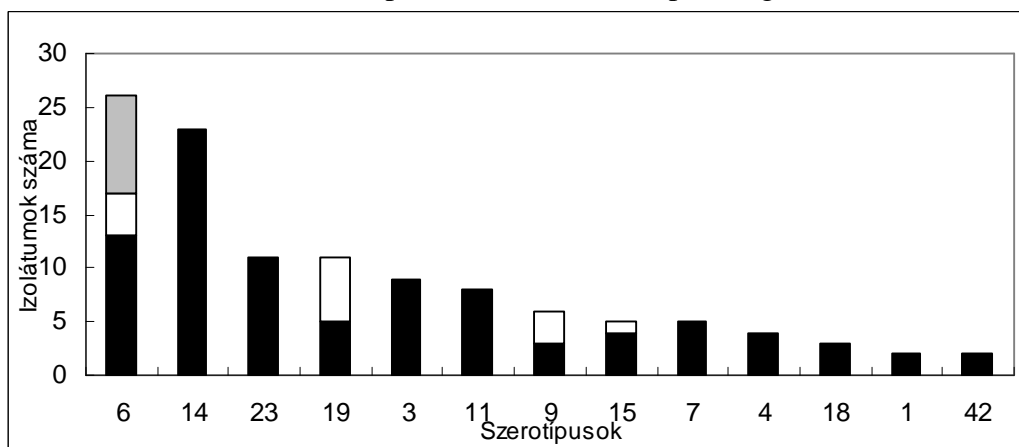
Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során a MIC értékeket határoztuk meg, agarhígítási módszerrel illetve Etest-tel. A kiértékelés az EUCAST breakpointok alapján történt. Az eredmények az 1. táblázatban láthatók összefoglalva. Összesen 8 darab penicillin rezisztens törzset találtunk, de ezek MIC 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 (valószínűleg az *erm* gének miatt), egy részük pedig (n=20) az ún. M fenotípust mutatja (*mef* gének). A fluoroquinolon rezisztencia szerencsére még mindig nem ugrott föl magas szintre (l. 3. pont).

1. táblázat: Az invazív pneumococcusok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	MIC range	R%	S%
Penicillin	0.004-4	5.44%	60.54%
Cefotaxim	0.004-2	0%	91.95%
Imipenem	0.004-2	0%	100%
Erythromycin	0.06-≥512	36.81%	60.42%
Clindamycin	0.03-≥512	28.71%	71.29%
Telithromycin	0.004-0.5	0%	100%
Levofloxacin	0.38-8	1.35%	98.65%
Moxifloxacin	≤0.03-1	3.36%	96.64%
Vancomycin	0.125-1	0%	100%

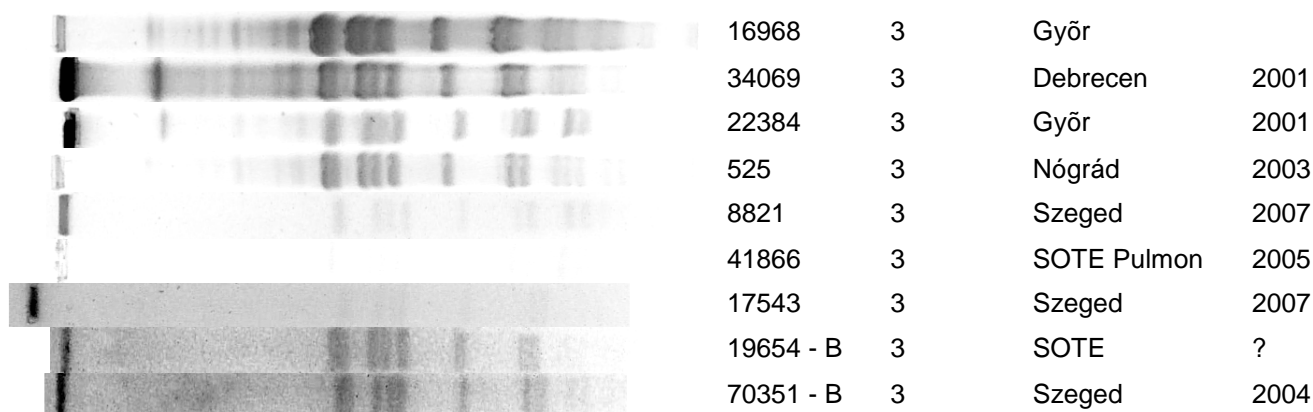
Összesen 118 törzset tudtunk sikeresen szerotipizálni (=78,7%), ami nagyon jó aránynak számít. A hagyományos antiszérumos módszert ötvöztük a PCR-alapú technikával (l. Metodikai fejlesztések /1. pont). A három leggyakoribb szerotípus a következő volt (l. ábra): 14-es (15,3%), 6A (8,7%) és 23F (7,3%). Emellett a 19-es (19A és 19F), 11A, és 3-as szerotípusok voltak még gyakoribbak. Ezen adatok alapján a *Prevenar* a fertőzések 52%-át védte volna ki. Ez nem túl magas szám, de figyelembe véve, hogy az oltásban csupán 7 szerotípus szerepel, nem is rossz az arány és mindenképpen javasolható a kisgyerekek vakcinálása. A közeljövőben egyébként két újabb konjugált oltás kerül piacra, amelyek 10, illetve 13 szerotípust tartalmaznak majd; ezek lefedettsége már 57, illetve 67%-ra javul.

1. ábra: A 118 invazív pneumococcus szerotípus megoszlása



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. Így például mind a kilenc 3-as szerotípusú izolátum teljesen azonos volt, bárhonnan és bármelyik évből származott (2. ábra). Volt pl. egy másik nagyobb klón, ami 14-es és 9-es szerotípusú törzseket is magába foglalt.

2. ábra: A 3-as szerotípusú izolátumok klonalitása



Az eredményeket a 2008. áprilisi ECCMID kongresszuson ismertettük poszter formájában, ezenkívül hamarosan nemzetközi folyóiratban is (pl. JAC) szeretnénk publikálni az anyagot. Az egyik TDK hallgató a 2008 februári TDK konferencián 3. helyezést ért el vele. Ebből az anyagból készült az a cikk is, amely az *Élet és Tudomány* és OTKA által meghirdetett közös cikkpályázaton II. helyezést ért el (Dobay Orsolya: Egy védőoltás előélete. *Élet és Tudomány*, 2008, **48**:1517-1519.)

## 2) Óvodások orrában hordozott pneumococcusok epidemiológiai felmérése

Szintén a *Prevenar* oltás megjelenése ad különös jelentőséget a pneumococcus hordozás felmérésének is. A (különösen a közösségbe járó, azaz óvoda vagy bölcsődés) kisgyerekek 50-100%-a hordozza orrában ezt a patogént, ezáltal forrása lehet egy, a környezetében élő gyengébb immunitású személy (kistestvér, nagyszülő) fertőzésének. Számos országban vizsgálták már a kisgyerekek pneumococcus hordozását, de Magyarországon nem történt még ilyen jellegű felmérés. Ezt a hiányt pótolva szeretnénk

lehetőleg néhány száz kisgyerektől (főleg óvodásoktól) mintát venni, és nézni a hordozott pneumococcusok szerotípusát, antibiotikum érzékenységét és genetikai összetartozását. A *Prevenar* bizonyítottan hatással van a hordozásra is, tehát nagyon fontos még a jelenlegi átmeneti időszakban összehasonlítani a már beoltott és még oltatlan gyerekek hordozását.

Egyelőre 34 mintát dolgoztunk föl, ami egy szegedi óvodásból származott, és emellett megkezdtük további óvodások szűrését (Hajdúszoboszlóban, illetve Győr környékén). Ez a 34 minta i már számos tanulsággal szolgált. A 34 törzsből 25 szerotípusát sikerült meghatározni (=73,5%). A két leggyakoribb szerotípus a 6A és a 14 volt, emellett szerepelt még a 3-as, 13-as, 9-es, 18-as, 19-es típus. Eszerint az izolátumok bő 50%-át fedné le a *Prevenar*. Penicillinre rezisztens izolátum nem volt, azonban a törzsek harmada rezisztens volt makrolidokra. Ezek közül 7 esetben nagyon magas szintű (MIC>256 mg/L) rezisztencia volt mind erythromycinre mind clindamycinre (ebből 4 törzsben megtaláltuk az *ermB* gént), 5 esetben pedig az M fenotípus alakult ki (Ery MIC = 8-24 mg/L, Clinda: érzékeny). Ez az 5 törzs mind 14-es szerotípusú volt, a *mef* génnel rendelkeztek (=efflux pumpa), és azonos PFGE klón tagjai voltak (3. ábra). A 3 darab 3-as szerotípusú törzs is klonális volt. Egy érdekes példát találtunk szerotípus váltásra is: egy 14-es és egy 13-as szerotípusú törzs genetikailag azonos volt. Vagyis már ilyen kis számú minta vizsgálatánál is nyilvánvalóvá válik, hogy a gyerekek egymás között továbbadják a pneumococcusokat, és a sikeresebb klónok terjednek jobban közöttük.

3. ábra: Az öt M fenotípusú izolátum PFGE mintázata



Ezt az anyagot a 2009-es ECCMID kongresszusra (Helsinki) küldtük be, és el is fogadták az absztraktot. Ezenkívül egy TDK hallgató a 2009 februári SOTE-s TDK kongresszuson harmadik helyezést ért el vele. Amint meglesz elegendően nagyszámú hordozott izolátum, az anyagot feltétlenül közölni szeretnénk nemzetközi folyóiratban is.

### 3) Fluoroquinolon (FQ) rezisztencia vizsgálata

Pneumococcusokban az FQ rezisztenciát a giráz (*gyrA*, *gyrB*) és topoizomeráz (*parC*, *parE*) génben létrejövő pontmutációk hozzák létre. Az egyik génben kialakult mutáció csak az érzékenység csökkenéséhez vezet, de az ezt követő, másik génben bekövetkező mutáció azonnal magas szintű rezisztenciát eredményez. 304 pneumococcus törzsből álló gyűjteményünkben fenotípusosan 5 bizonyult ciprofloxacin rezisztensnek (= 1,64%), de a többi (újabb) FQ-ra (levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin) még ezek az izolátumok is érzékenyek voltak. A *par* és *gyr* gének szekvenálása alapján összesen öt törzs tartalmazta az irodalomból már ismert Lys-137-Asp aminosav-cserét eredményező pontmutációt a *parC* génben, és ezek közül kettő az érzékenyek közé tartozott. Ez azt jelenti, hogy ez a bizonyos első mutáció a MIC alapján érzékenyek minősített törzsekben is jelen van, ami különös veszélyt jelent a magas szintű mutáció hirtelen és váratlan megjelenése szempontjából. Jónéhány törzsben jelen volt a PmrA efflux pumpa is.

A Szegedi Tudományegyetem Klinikai Gyógyszerészeti Intézetének munkatársaitól kapott magyarországi antibiotikum felhasználási adatok meredek emelkedést mutatnak, a FQ-ok fogyasztása bevezetésük óta (levo: 2000, moxi: 2001) több mint 10-szeresére nőtt. Már

korábban tapasztaltuk, hogy az egyes FQ-ok évről évre mért MIC értékei fokozatosan nőnek; egyelőre még az érzékeny tartományban vannak, de talán hamarosan átlélik a rezisztencia küszöböt.

A vizsgálatok eredményeit összefoglaló cikk: O. Dobay, F. Rozgonyi, Á. Ghidán, M. Matuz, K. Nagy, S.G.B. Amyes (2006): The first steps towards fluoroquinolone resistance in Hungarian pneumococci. *Journal of Chemotherapy* 18:624-627.

## Metodikai fejlesztések

### 1) Pneumococcusok szerotipizálása PCR-rel

A pneumococcusoknak 91 különböző szerotípusuk lehet a tok antigén (cps) alapján. A legújabb, 91. pneumococcus szerotípust (=6C) 2008. áprilisban írták le.

Az epidemiológiai vizsgálatokban ennek meghatározása egyrészt azért fontos, mert az egyes szerotípusok összefüggésbe hozhatók bizonyos betegségtípusokkal (pl. invazív fertőzések), antibiotikum rezisztenciával vagy virulenciával, másrészt a pneumococcus elleni védőoltás is a tok antigéneken alapszik.

A szerotípust konvencionálisan antitestekkel szokták meghatározni, tokduzzadási reakcióval vagy tárgylemez agglutinációval. Ezek kivitelezése drága reagenseket, sok időt, nagy ügyességet és türelmet igényel. Ezek elkerülésére több kutatócsoport is próbálkozott már a szerotípus PCR-rel való meghatározásával.

Mi Brito és mtsai (Brito, JCM, 2003) rendszerét vettük alapul és fejlesztettük tovább. A módszer lényege az, hogy a törzseket először egy multiplex PCR-rel 6 nagyobb csoportba lehet sorolni a kapott gélek függvényében, majd egyedi primerekkel meghatározható a konkrét szerotípus az adott csoporton belül. Egyre több cps gén szekvenciája hozzáférhető, ami lehetőséget adott újabb primerek tervezésére. Mi a Brito által eddig leírt szerotípus-specifikus primerek (1, 3, 4, 6, 14, 19A, 19F, 23F) mellett a Magyarországon előforduló más szerotípusokra is primereket terveztünk (2. táblázat). Különösen fontosnak tartottuk az invazív izolátumok között előforduló szerotípusok meghatározására alkalmas primerek tervezését.

2. táblázat: Az általunk tervezett szerotipizáló PCR primerek

Szerotípus	PCR termék	Target gén	Mivel reagál még:
5	366 bp	wzy	-
6A-6B	303 bp	wzg	-
7F	528 bp	wzy	7A
9V	242 bp	cps9vG	9A
11A	379 bp	wzy	11F, 11D
13	308 bp	wzy	-
15A	409 bp	wzy	15F
15B	493 bp	wzy	15C
18C	285 bp	wzy	18A, 18B, 18F
20	195 bp	wzy	-
23A	823 bp	wzy	-
33F	171 bp	wzy	33A, 37
42	492 bp	wzy	35A, 35C

Az új primerek tervezésénél három dologra kellett odafigyelni: ezek működjenek az adott PCR ciklusban, ne amplifikáljanak más szerotípus esetén és a PCR termék nagysága

legyen eltérő a csoport többi tagjától, hogy szükség esetén multiplex PCR-ben el lehessen végezni a reakciót.

Legnehezebb a 6A és 6B szerotípusok megkülönböztetésére alkalmas primerek tervezése volt, mivel ez a két cps lókuszt nagyfokú (>97%) azonosságot mutat egymással. Végül egyetlen olyan helyet találtunk a cps régióban, ami kellő mértékű különbséget mutatott (4. ábra), azaz amire megfelelő primert tudtunk tervezni, de így is csupán a *forward* primer különböző, a *reverse* ugyanaz – ezért a termék ugyanakkora mind 6A, mind 6B esetén (2. táblázat), vagyis ezt a reakciót mindenképpen külön-külön kell elvégezni (célszerű előbb a gyakoribb 6A-val próbálkozni). Ezen nehézségek ellenére nagyon fontos volt ezt a két, egyébként rezisztencia tulajdonságaiban igen eltérő szerotípust PCR-rel megkülönböztetni.

#### 4. ábra: Az általunk tervezett 6A-6B primerek

```

...
6A TAC--ATGGGAAGTTCATTTCCAGTAGGGAATGTCCATCTAGACTCTGAGCAGGCTCT 1291
6B TACGAATGGAAAGT--ATTACCCTGTAGGCAATGTTTCATCTTGATTCAGAACAGGCTCT 2276
*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * *
6A AGGTTTTGTACGTGAACGCTACTCACTAGCCGATGGAGACCGTGACCGTGGTCGCAACCA 1351
6B CGGTTTTGTTTCGTGAGCGCTACTCACTAGCAGATGGCGATCGTGACCGTGGTCGCAACCA 2336
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * *
6A ACAAAGGTCATTGTAGCAATTATTAAGAAGTTAACTTCTACAGAGTTTTGAAAACTA 1411
6B ACAAAGGTCATTGTAGCAATTATTAAGAAGTTAACTTCTACAGAGTTTTGAAAACTA 2396
*****
6A TAGTAGTATTCTTCAAGGATTGCAGGATTCTCTTCAAACAAATATGCCGATTGAGACTAT 1471
6B TAGTAGTATTCTTCAAGGATTGCAGGATTCTCTTCAAACAAATATGCCGATTGAGACTAT 2456
*****
6A GATAGATTTAGTGAATACTCAGTTGGAGAGTGGAGGGAATTATAAAGTAAATTCGCAAGA 1531
6B GATAGATTTAGTGAATACTCAGTTGGAAAGTGGGGGGGATTATAAAGTAAATTCGCAAGA 2516
*****
6A CTTGAAAGGTACAGGTCGGATGGATCTTCTTCTTATGCAATGCCAGACAGTAACCTCTA 1591
6B TTTAAAAGGGACAGGTCGGATGGATCTTCTTCTTATGCAATGCCAGACAGTAACCTCTA 2576
*** ** ** ** * * * * *
...

```

Az eredményeket a 2007-es ECCMID kongresszuson, illetve egy 2007-es svájci pneumococcus-os kongresszuson ismertetem poszter formájában. Hamarosan nemzetközi folyóiratban is szeretnénk publikálni az anyagot (pl. Letters in Applied Microbiology), a következő pontban leírt optimalizációval együtt.

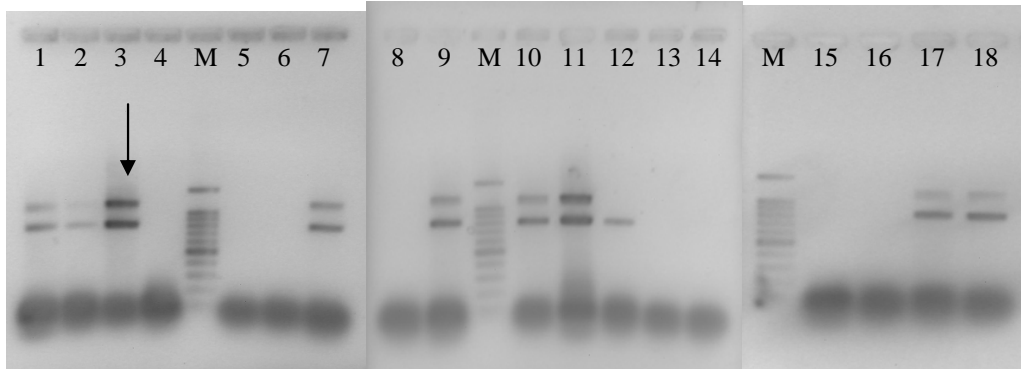
## 2) Multiplex PCR beállítása Taguchi optimalizációs módszerrel

Az előző pontban ismertetett első multiplex PCR eleinte nem mindig működött megbízhatóan, ezért egy korábban általunk ELISA-hoz sikerrel alkalmazott optimalizációs rendszerhez folyamodtunk segítségért ennek beállítására. A Taguchi módszerrel a kísérletben szereplő paraméterek közül hatot lehet változtatni, ezek közül az egyiknek 6 különböző értéke lehet, a többinek 3-3, vagyis ideális egy olyan komplex rendszer optimalizálásához, mint pl. egy multiplex PCR. Az ortogonális kísérleti elrendezés miatt az összes lehetséges variáció helyett összesen csupán 18 kísérletet kell elvégezni, és így is minden egyes paraméter individuális hatása megnyilvánul.

Mi a következő paramétereket változtattuk: (1) DNS templát (főzéssel feltárt baktérium vagy csak belemártva a kacs), (2) polimeráz (Taq, Tth, AmpliTaq Gold) és pufferje, (3), primer koncentrációk, (4) MgCl<sub>2</sub> koncentráció és (6) nukleotid koncentráció. Az eredmény az 5. ábrán látszik. A legfontosabb paraméter a templát volt: csak akkor működik jól a reakció, ha a táptalajról levett baktériumot a PCR mixbe kaccsal belemártjuk,

valószínűleg ekkor megfelelő a templát/primer arány. Érdekes, hogy mindhárom polimeráz esetében találtunk megfelelő beállítást, de a legjobb a Tth polimeráz volt, de Taq pufferrel (3. beállítás, a 2. ábrán nyíllal megjelölve). A primerek mennyiségét a cikkben eredetileg szereplő szokatlanul nagy koncentráció helyett lecsökkentettük 1/10-ére. A kísérlet eredményeképp megbízhatóan és reprodukálhatóan működő multiplex PCR-t sikerült beállítani, amit azóta már közel 100 törzsnél alkalmaztunk.

5. ábra: A Taguchi optimalizáció eredménye (jó az, ahol 2 band látszik)



### 3) PFGE optimalizáció Taguchi módszerrel

Az előző pontban ismertetett Taguchi módszert alkalmaztuk a hasonlóan bonyolult pulsed-field gélelektroforézis (PFGE) optimalizálására is. Ez *Streptococcus pneumoniae* esetében a nemzetközileg is használt „gold standard” módszer, és valamennyi epidemiológiai felmérésben ezt alkalmazzuk, csak néha nem látszanak élesen a bandék. A sokszori ismétlés pedig sok időt és pénzt emészt fel.

Az optimalizáció során a következő paramétereket változtattuk: i) Baktérium szuszpenzió készítése 1 vagy 2 véres agarról, vagy BHI-ből („brain heart infusion” tápleves), illetve eredeti szuszpenziós pufferrel, SDS-sel (nátrium-lauril-szulfát), PBS-sel (foszfát puffer), EDTA-val (etilén-diamin-tetra-ecetsav); ii) A baktérium beágyazása agaróz „plug”-okba: plug agaróz készítés EC lízis pufferrel, PBS-sel, TBE-vel (TRIS-borát-EDTA), SDS-sel, TE-vel (TRIS-EDTA), TAE-vel (TRIS-acetát-EDTA); iii) Lízis-1: sejtfal bontás lizozimmal 37°C-on, 25°C-on, 52°C-on, illetve litikázzal, SDS-sel, EDTA-val különböző ideig (1-2-3 óra); iiiii) Lízis-2: fehérje-mentesítés proteináz K-val (1 óra, 3 óra, vagy overnight), iiiiii) Emésztés restriktációs enzimmal: 2 óra, 4 óra, vagy overnight.

Eredmények: baktérium szuszpenzió készítése 1 plate-ről és BHI-ből hasonlóan jó eredményt adott, a szuszpendálásra az eredeti pufferen kívül PBS és EDTA is használható, SDS viszont nem. A plug agaróz EC lízis pufferrel, PBS-sel és TBE-vel is készíthető, SDS viszont erre sem volt alkalmas. A sejtfal feltárása lizozimon kívül litikázzal és SDS-sel is működött, sőt a lizozim nem csak 37°C-on, hanem 25°C-on is aktív volt. Sem a lízis-2 időnek, sem az emésztési időnek nem kell overnight-nak lennie, elég 3 illetve 4 óra is, ezáltal a folyamat jelentősen lerövidíthető.

Ezt a munkát az egyik TDK hallgatóm végezte el, aki az anyaggal a februári SOTE-s TDK konferencián szerepelt.

#### 4) Genotipizáló módszerek (PFGE és MLST) összehasonlítása

Az epidemiológiai vizsgálatokban a PFGE mellett leggyakrabban használt genotipizáló módszer a multilocus sequence typing (MLST). Ezt a két módszert szeretnénk volna közvetlenül összehasonlítani egymással a pneumococcusok esetében. A kísérletben szerepelt 30 olyan 14-es szerotípusú skóciai pneumococcus izolátum, amelyek MLST eredménye (sequence type, ST) azonos volt, illetve 26 olyan magyar törzs, amelyek azonos vagy nagyon hasonló PFGE mintázatot mutattak, és kétféle szerotípusba tartoznak (12 db 6A és 14 db 23F). Ez utóbbi törzseket elküldtem a glasgow-i Skót Pneumococcus Referencia Laboratóriumba MLST vizsgálatra, míg a 30 skóciai törzs PFGE analízisét mi végeztük el.

A 30 skót törzs PFGE vizsgálata nagyon kis (1-3 band) eltérést mutatott. Ugyanakkor a PFGE alapján hasonló törzsek két teljesen különböző fő ST-be tartoztak. Az egyik a 12 6A szerotípusú izolátumot foglalta magába, míg a másikba a 14 23F szerotípusú törzs közül 11 tartozott (ezek kismértékű eltérést mutattak PFGE-vel). A másik három 23F szerotípusú törzs két további ST-be tartozott, de ezek is csak 1-3 band eltérést mutattak a többiekhez képest. Ez arra vezethető vissza, hogy az MLST határozottabban, élesebben kategorizál, mivel ez a módszer a szekvenciabeli különbségeken alapul, míg a PFGE érzékenyebb a kisebb genetikai változásokra. Ezért egy olyan genetikailag igen változatos baktérium esetében, mint a pneumococcus, a PFGE alkalmasabb módszer a kisebb, regionális változások nyomkövetésére egy rövidebb időintervallumon belül, míg az MLST inkább nagyobb lélegzetű, nemzetközi összehasonlításokra alkalmas, mivel felülemelkedik ezeken a lényegtelenebb változásokon.

Az eredményekből a 2007-es ECCMID kongresszuson poszter formájában számoltunk be. Majd nemzetközi folyóiratban is szeretnénk publikálni az anyagot.

#### 5) *Pneumococcusok* tenyésztése aktív szén tartalmú táptalajon

Ez a kutatási rész szintén egy TDK hallgató feladata. Köztudomású, hogy a pneumococcusok szállítás során aktív szén tartalmú transzport közeget igényelnek, ezen akár egy hétig is életképesek maradnak, jóllehet rendes körülmények között már 2 napon belül autolízis miatt kihalnak. Az a hipotézisünk, hogy valószínűleg az aktív szén megköti az autolizint, és ezért nem csupán a transzportálás során, de a mindennapi rutin feladatokban is hasznosítható lenne. Ezért kiválasztottunk 10 különböző szerotípusú pneumococust, és kioltottuk őket sima véres agarra, valamint 0,5 illetve 1% aktív szén tartalmú véres agarra. A telepekből elvégezve az autolizis gén amplifikációját, az a tendencia volt megfigyelhető, hogy legerősebb terméket a sima agaron növesztett törzsek esetén kaptunk, azaz mintha az aktív szén génrepressziót is okozna. Természetesen ezt a hatást még tovább vizsgáljuk, olyan kísérletet tervezünk, amiben megfigyeljük más gének amplifikálhatóságát is.

Ezenkívül a törzsek hosszabb ideig tartó túlélése számos kísérletben nagyon hasznos lenne. A pneumococcusok két nap alatt az autolízisük következtében kipusztulnak a táptalajokon. Ha ezt az időtartamot meg lehetne hosszabbítani, és nem kellene naponta feltétlenül átoltani őket, az nagy könnyebbség lenne. Így például az 5 napos PFGE protokoll esetében elkezdhetnénk a kioltást előző héten, és nem lenne probléma a hétvége.