



Nosocomialis infekciókat okozó baktériumok tipizálásának jelentősége a kórházi járványok felderítésében

Pászti Judit

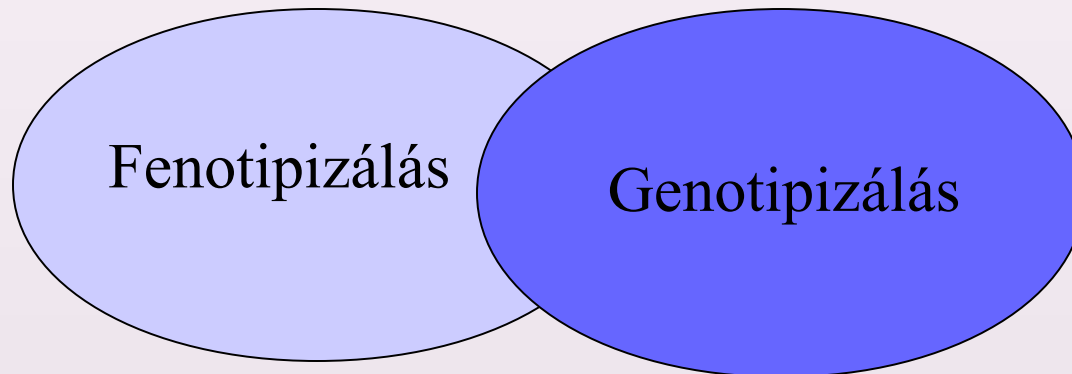
OEK Fágtypizálási és molekuláris epidemiológiai
osztály



Tipizálás - általában

Bakteriológiai tipizálási eljárások:

előzetesen izolált és identifikált baktérium fajok speciesen belüli differenciálására szolgáló eljárások, melyek segítségével **két vagy (több), azonos specieshez tartozó baktérium izolátum összehasonlítható.**





Molekuláris tipizálás –molekuláris epidemiológia alkalmazása

- Meghatározható baktérium specierek egyes klónjainak elterjedése időben és térben;
- Elkülöníthetők járványosan és endémiásan előforduló baktérium klónok;
- fertőzés terjedésének módjának és útjának nyomonkövetése;
- Multirezisztens és fokozott virulenciájú „veszélyes törzsek” azonosítása, figyelem felhívása;

Időben-térben elhúzódó
„sporadikus” esetek
Retrospektív vizsgálat

Járvány kialakulása
során beteg, hordozó,
környezet
„real time” vizsgálat

Monitoring,
specierekre,
genetikai
klónokra,
valamint
„rizikó
osztályokra”
vonatkozóan



A tipizálási módszerek kritériumai

- Stabilitás
- Tipizálhatóság, diszkriminatívitas
- Epidemiológiai adatokkal való összhang (sporadikus-járványos)
- Reprodukálhatóság
- Teszt anyag minimum mennyisége (n=100)



A megfelelés kritériumai

- Flexibilitás (széles species spektrum kis módosítással)
- Gyorsaság
- Műszer-reagens igény
- Kivitelezhetőség
- Ár
- Számítógépes értékelés – adatbázis építés



A járványügyi tipizálás szintjei

- Lokális szint: kórház, egyes részlegek, hosszú ápolási intézmény, egészségügyi otthon, stb. - fenotípusos jegyek (pl. sajátos antibiotikum rezisztencia kép);
- Országos szint – tipizáló laboratóriumok, referencia laboratóriumok – adatbázisok-klónok azonosítása
- Globális szint – nemzetközi munkacsoportok és adatbázisok – nemzetközileg széles terjedő klónok azonosítása – „alert” rendszerek



Tipizálási módszerek

DNS alapú módszerek

PCR alapú
módszerek

RAPD
AP-PCR
(ERIC1;2)

Pl. Enterobacter spp.

Nem-PCR
alapú módszerek

Plazmid tipizálás
PFGE

Klebsiella spp.
S.aureus, MRSA,
Pseudomonas spp.,
Acinetobacter spp.,
E. coli, Citrobacter sp.,
Streptococcus spp.

Szekvencia
alapú módszerek

SLST (egy locus)
MLST (háztartási gének)

S. pyogenes,
N. meningitidis,
S. aureus, Klebsiella spp.,

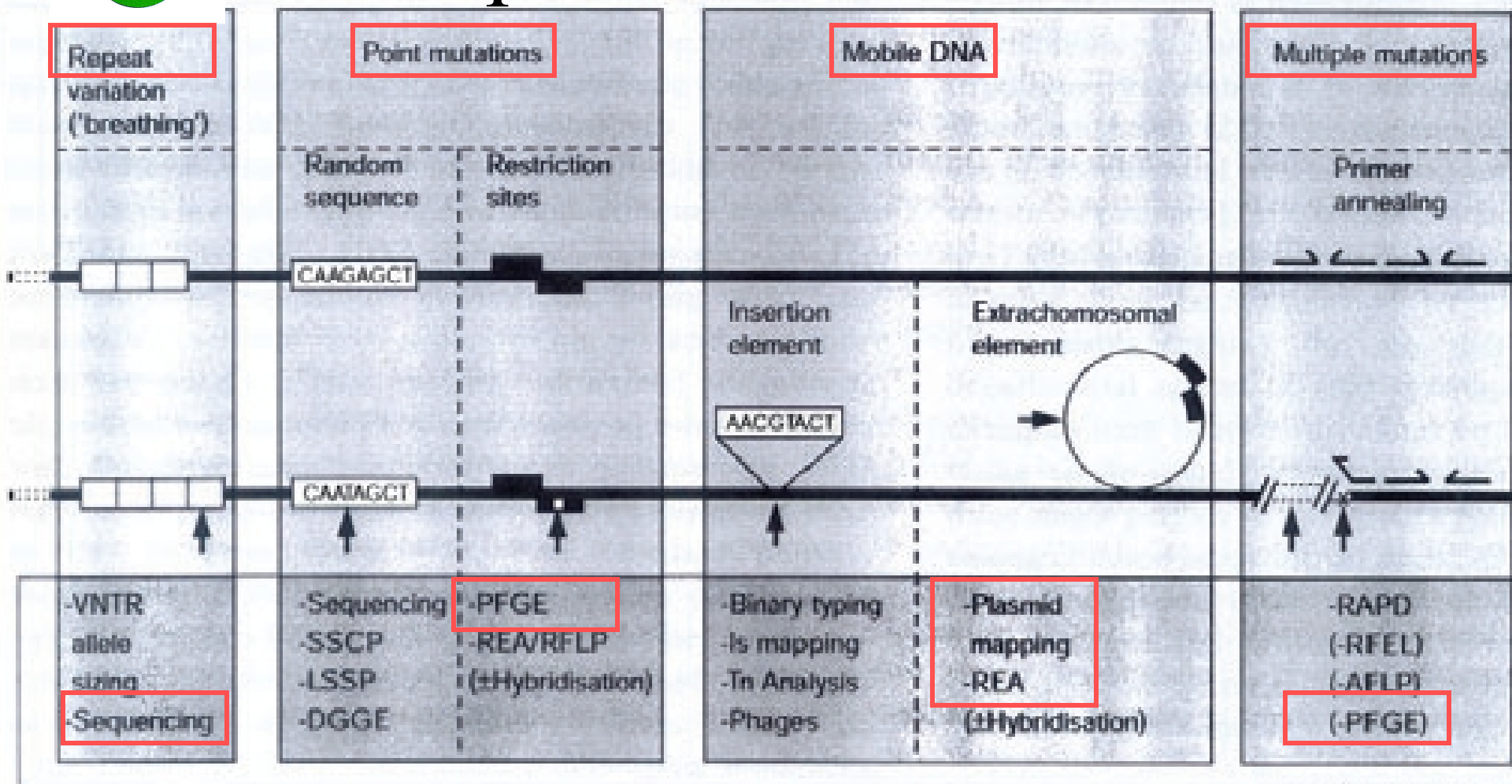


Módszerek

- **RAPD analízis**: tetszőleges rövid primerek használata véletlenszerű (előre nem ismert) DNS szakaszok amplifikációjához nem túl szigorú PCR feltételek mellett. ERIC primerek;
- **PFGE**: a **teljes** genom makrorestrikciós profilvizsgálata gélelektroforézissel, speciális, váltakozó irányú elektromos erőter használataival;
- **MLST**: meghatározott számú háztartási gén (lassan változó gének, melyek nincsenek kitéve a szelekciós nyomásnak) allél variációi alapján **szekvencia típusok** (ST) meghatározása.



Tipizálási módszerek



© 1997 Current Opinion

Molecular concepts associated with genetic variability

A. van Belkum et al.: Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology, Journal compilation 2007 Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 13 (Suppl. 3), 1–46.



Módszerek összehasonlítása

| Módszer | Diszkriminativitás | Tipizálhatóság (%) | Reprodukálhatóság | Idő | Költség |
|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------|----------|
| PFGE | jó | 100 | jó | 2-4nap | átlagos |
| Ribotipizálás | alacsony | 100 | jó | 3-4nap | átlagos |
| RAPD | átlagos | 70-80 | alacsony | <1nap | alacsony |
| AFLP | jó | 100 | jó | 2-3nap | átlagos |
| MLST | Nagyon jó* | 100 | jó | 2-3nap | magas |
| Szerotipizálás | átlagos | 60-70 | közepes | <1nap | alacsony |

*: species függő



Vizsgálataink területe - **PFGE**

- *Acinetobacter spp.*
- *Enterobacter spp.*
- *Enterococcus spp.*
- *Escherichia coli*
- *Legionella spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- *Serratia marcescens*
- koaguláz negatív *Staphylococcus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Stenotrophomonas maltophilia*....

- *Klebsiella spp* – **nemzeti adatbázis**
- *MRSA* – **nemzeti adatbázis**



Vizsgálataink területe – Szekvencia meghatározás

- *Staphylococcus aureus* törzsek *spa* gén tipizálása, **MLST**
- *Klebsiella pneumoniae* törzs **MLST** vizsgálata
- *Streptococcus pyogenes* törzs *emm* gén tipizálása
- *Neisseria meningitidis* PorA gén variábilis régióinak (VR1, VR2 és VR3) szekvenálása
- ESBL rezisztencia gének azonosítása *Enterobacteriaceae* törzseknél
- *Klebsiella spp.*
- *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*
- Antibiotikum rezisztencia típus meghatározása (több, mint 60 különböző rezisztencia determináns meghatározása)



A kórházi járványok felderítése,

a járvány láncolatának nyomkövetése, forrás azonosítás;

- „kórházi flóra” monitorozása;
- virulens klónok elterjedtségének vizsgálata;
- antibiotikumokkal szembeni rezisztencia és egyéb virulenciát fokozó markerek terjedésének nyomkövetése
- korszerű országos adatgyűjtés és feldolgozás;

molekuláris epidemiológiai (tipizálási) vizsgálatok nélkül nem valósíthatók meg!

Időben (térben) elhúzódó
„sporadikus” esetek
Retrospektív vizsgálat

Járvány kialakulása
során beteg, hordozó,
környezet
„real time” vizsgálat

**virulens klónok
monitorozása -
„rizikó osztályok”**



MBL (metallo-béta-laktamáz), termelő nosocomialis kórokozók

- MBL: enzimek csoportja, amelynek tagjai képesek hidrolizálni a penicillineket, cephalosporinokat és karbapenemeket;
- Integronok hordozhatják ezeket a géneket – szerkezetükben, lokalizációjukban variabilitás
- In vitro igazolt a konjugációval történő átvitel – horizontális terjedés lehetőségének bizonyítása
- Megfigyelhető terjedése világszerte
- Kapcsolódó multirezisztencia – panrezisztencia

Pseudomonas aeruginosa (O11 és O12 szerotípus) – Libisch B. et al

Aeromonas hydrophila – Libisch B. et al

Acinetobacter baumannii

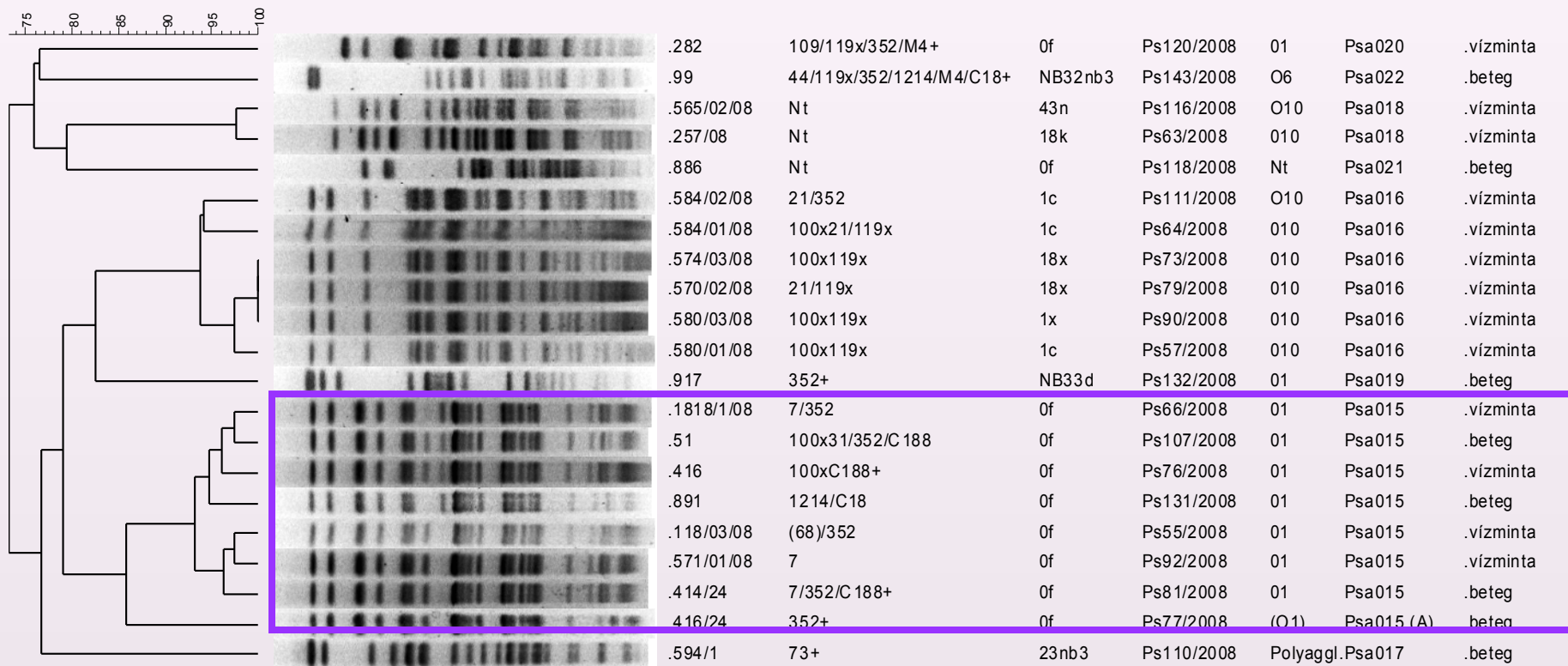
Klebsiella pneumoniae

Proteus mirabilis



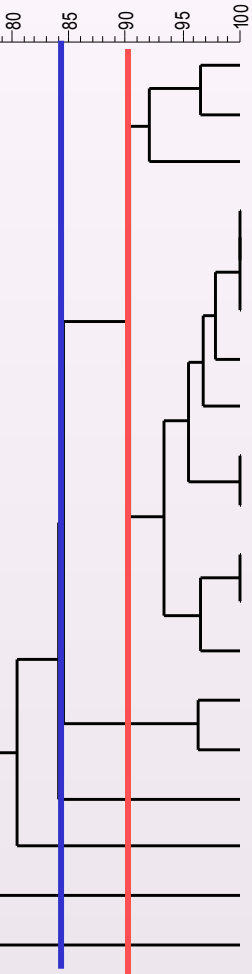
Multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* PFGE

Kórházi (ITO) csaptelepek monitorozásából (szűrővel és szűrő nélküli használat) származó *P. aeruginosa* törzsek PFGE vizsgálata (OKI Vízbakteriológiai osztályal)





Multirezisztens *Acinetobacter* spp. törzsek retrospektív vizsgálata - PFGE



| | | | | | |
|------------|-----------------|----------------|----------|---|------------|
| Ac4/09-01 | KAIBO | trachea | AC001 | } | 2009-01-26 |
| Ac13/09-01 | KAIBO | bronchus | AC001 | | 2009-02-09 |
| Ac3/09-01 | KAIBO | trachea | AC001 | } | 2009-02-09 |
| Ac22/08-07 | Intenzív | vér | AC001 | | 2008-06-11 |
| Ac24/08-07 | Intenzív | ? | AC001 | } | 2008-06-26 |
| Ac28/08-07 | Intenzív | melkas punk. | AC001 | | 2008-07-21 |
| Ac25/08-07 | Intenzív | ? | AC001 | } | ? |
| Ac30/08-07 | Sebészeti | seb | AC001 | | 2008-07-16 |
| Ac33/08-10 | Urológia | seb | AC001 | } | 2008-09-23 |
| Ac21/08-07 | Intenzív | vér | AC001 | | 2008-07-25 |
| Ac2/08-01 | Aneszteziológia | agykamra drain | AC001 | } | 2007-10-02 |
| Ac5/08-01 | Sebészeti | seb | AC001 | | 2007-10-17 |
| Ac4/08-01 | Nefrológia | trachea | AC001 | } | 2007-10-11 |
| Ac1/08-01 | Aneszteziológia | vizelet | AC001-A1 | | 2007-09-19 |
| Ac3/08-01 | Kardiológia | vér | AC001-A1 | } | 2007-10-08 |
| Ac6/08-01 | Nefrológia | seb | AC001-A2 | | 2007-11-12 |
| Ac31/08-10 | KAIBO | seb | AC004 | } | 2008-09-22 |
| Ac34/08-10 | Érsebészeti | seb | AC005 | | 2008-09-26 |
| Ac2/2007 | Független | trachea | AC006 | | 2007 |

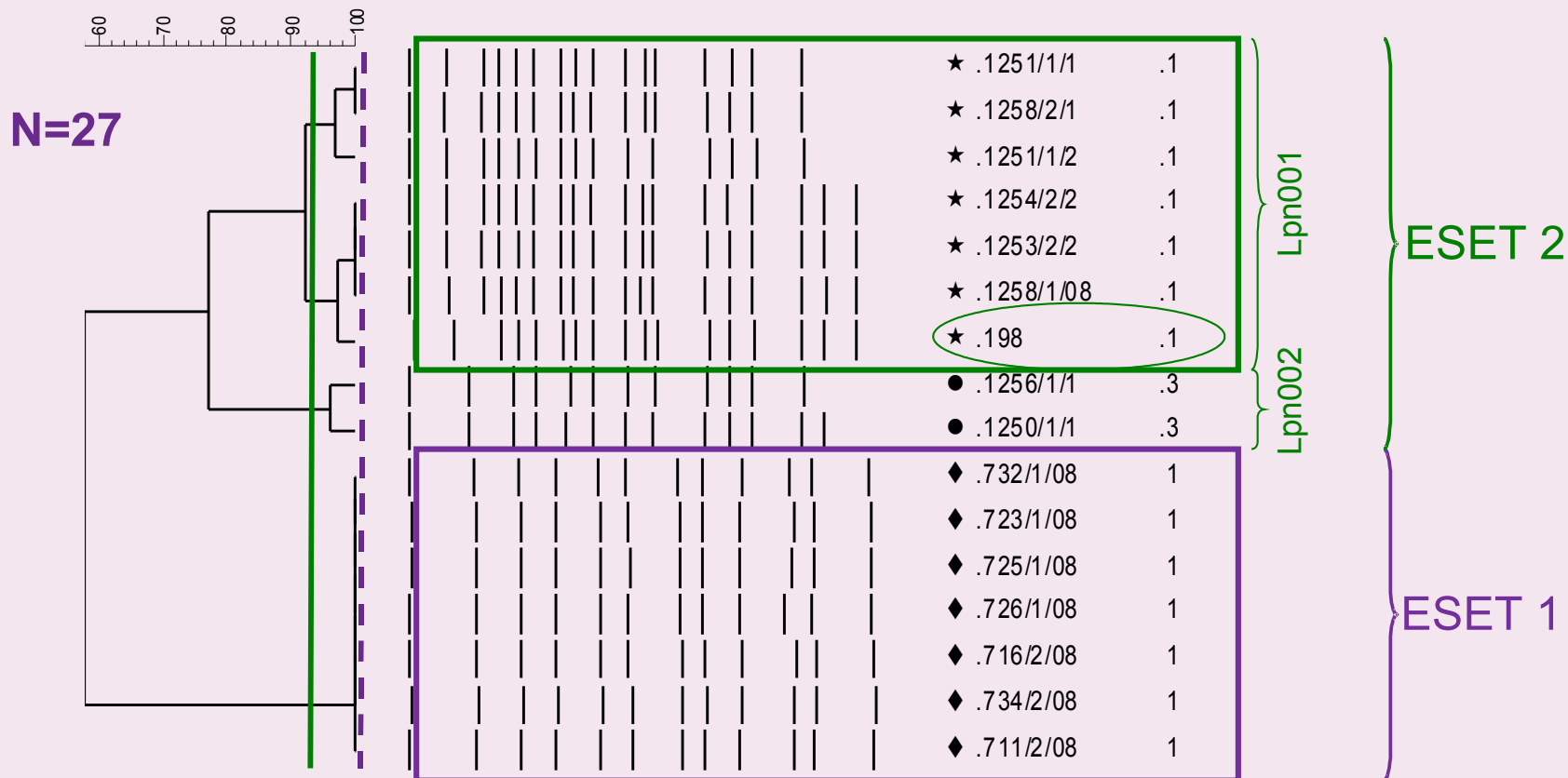


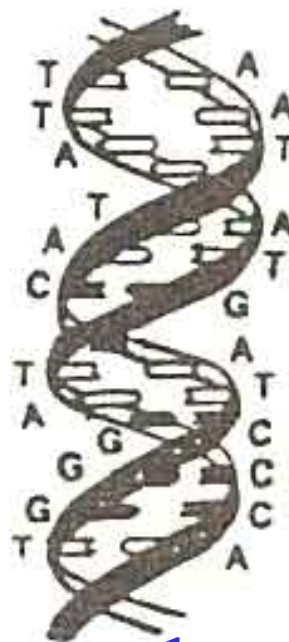
Legionella pneumophila

PFGE vizsgálat eredményei

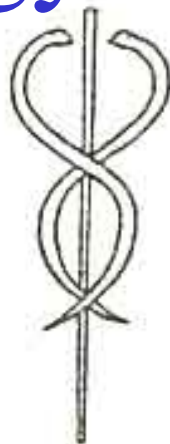
Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Legionella_9812 Legionella_9812

Vizsgálati módszer: kromoszóma restrikciós enzim emésztést követő PFGE (pulzálatott mezejű gél elektroforézis).





Köszönöm a figyelmet



Elérhetőségek:
paszti.judit@oek.antsz.hu
www.oek.hu



Nosocomialis infekciókat okozó baktériumok tipizálásának jelentősége a kórházi járványok felderítésében

Pásztai Judit

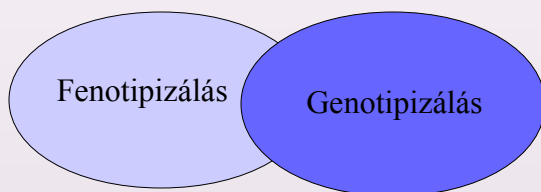
OEK Fágtypizálási és molekuláris epidemiológiai
osztály



Tipizálás - általában

Bakteriológiai tipizálási eljárások:

előzetesen izolált és identifikált baktérium fajok speciesen belüli differenciálására szolgáló eljárások, melyek segítségével **két vagy (több), azonos specieshez tartozó baktérium izolátum összehasonlítható.**





Molekuláris tipizálás –molekuláris epidemiológia alkalmazása

- Meghatározható baktérium speciestek egyes klónjainak elterjedése időben és térben;
- Elkülöníthetők járványosan és endémiásan előforduló baktérium klónok;
- fertőzés terjedésének módjának és útjának nyomkövetése;
- Multirezisztens és fokozott virulenciájú „veszélyes törzsek” azonosítása, figyelem felhívása;

Időben-térben elhúzódó „sporadikus” esetek
Retrospektív vizsgálat

Járvány kialakulása során beteg, hordozó, környezet
„real time” vizsgálat

Monitoring, speciestekre, genetikai klónokra, valamint „rizikó osztályokra” vonatkozóan



A tipizálási módszerek kritériumai

- Stabilitás
- Tipizálhatóság, diszkriminatívitas
- Epidemiológiai adatokkal való összhang (sporadikus-járványos)
- Reprodukálhatóság
- Teszt anyag minimum mennyisége (n=100)



A megfelelés kritériumai

- Flexibilitás (széles species spektrum kis módosítással)
- Gyorsaság
- Műszer-reagens igény
- Kivitelezhetőség
- Ár
- Számítógépes értékelés – adatbázis építés



A járványügyi tipizálás szintjei

- Lokális szint: kórház, egyes részlegek, hosszú ápolási intézmény, egészségügyi otthon, stb. - fenotípusos jegyek (pl. sajátos antibiotikum rezisztencia kép);
- Országos szint – tipizáló laboratóriumok, referencia laboratóriumok – adatbázisok-klónok azonosítása
- Globális szint – nemzetközi munkacsoportok és adatbázisok – nemzetközileg szélesen terjedő klónok azonosítása – „alert” rendszerek



Tipizálási módszerek

DNS alapú módszerek

PCR alapú módszerek

RAPD
AP-PCR
(ERIC1;2)

Pl. *Enterobacter* spp.

Nem-PCR alapú módszerek

Plazmid tipizálás
PFGE

Klebsiella spp.
S. aureus, MRSA,
Pseudomonas spp.,
Acinetobacter spp.,
E. coli, *Citrobacter* sp.,
Streptococcus spp.

Szekvencia alapú módszerek

SLST (egy locus)
MLST (háztartási gének)

S. pyogenes,
N. meningitidis,
S. aureus, *Klebsiella* spp.,

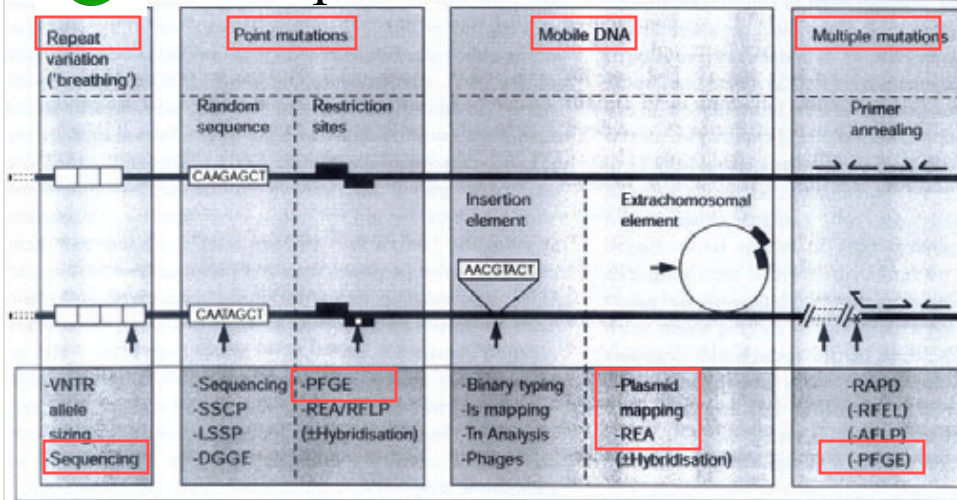


Módszerek

- **RAPD analízis**: tetszőleges rövid primerek használata véletlenszerű (előre nem ismert) DNS szakaszok amplifikációjához nem túl szigorú PCR feltételek mellett. ERIC primerek;
- **PFGE**: a **teljes** genom makrorestrikciós profilvizsgálata gélelektroforézissel, speciális, váltakozó irányú elektromos erőtér használatával;
- **MLST**: meghatározott számú háztartási gén (lassan változó gének, melyek nincsenek kitéve a szelekciós nyomásnak) allél variációi alapján **szekvencia típusok** (ST) meghatározása.



Tipizálási módszerek



© 1997 Current Opinion

Molecular concepts associated with genetic variability

A. van Belkum et al.: Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology, Journal compilation 2007 Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 13 (Suppl. 3), 1–46.



Módszerek összehasonlítása

| Módszer | Diszkrimi nativitás | Tipizál hatóság (%) | Reprodukál hatóság | Idő | Költség |
|----------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|--------|----------|
| PFGE | jó | 100 | jó | 2-4nap | átlagos |
| Ribotipizálás | alacsony | 100 | jó | 3-4nap | átlagos |
| RAPD | átlagos | 70-80 | alacsony | <1nap | alacsony |
| AFLP | jó | 100 | jó | 2-3nap | átlagos |
| MLST | Nagyon jó* | 100 | jó | 2-3nap | magas |
| Szerotipizálás | átlagos | 60-70 | közepes | <1nap | alacsony |

*: species függő



Vizsgálataink területe - **PFGE**

- *Acinetobacter spp.*
- *Enterobacter spp.*
- *Enterococcus spp.*
- *Escherichia coli*
- *Legionella spp.*
- *Pseudomonas spp.*
- *Serratia marcescens*
- koaguláz negatív *Staphylococcus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Stenotrophomonas maltophilia*....

- *Klebsiella spp* – **nemzeti adatbázis**
- *MRSA* – **nemzeti adatbázis**



Vizsgálataink területe – Szekvencia meghatározás

- *Staphylococcus aureus* törzsek *spa* gén tipizálása, **MLST**
- *Klebsiella pneumoniae* törzs **MLST** vizsgálata
- *Streptococcus pyogenes* törzs *emm* gén tipizálása
- *Neisseria meningitidis* PorA gén variábilis régióinak (VR1, VR2 és VR3) szekvenálása
- ESBL rezisztencia gének azonosítása *Enterobacteriaceae* törzseknél
- *Klebsiella spp.*
- *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*
- Antibiotikum rezisztencia típus meghatározása (több, mint 60 különböző rezisztencia determináns meghatározása)



A kórházi járványok felderítése,

- a járvány láncolatának nyomonkövetése, forrás azonosítás;
- „kórházi flóra” monitorozása;
- virulens klónok elterjedtségének vizsgálata;
- antibiotikumokkal szembeni rezisztencia és egyéb virulenciát fokozó markerek terjedésének nyomonkövetése
- korszerű országos adatgyűjtés és feldolgozás;

**molekuláris epidemiológiai (tipizálási)
vizsgálatok nélkül nem valósíthatók meg!**

Időben (térben) elhúzódó
„sporadikus” esetek
Retrospektív vizsgálat

Járvány kialakulása
során beteg, hordozó,
környezet
„real time” vizsgálat

**virulens klónok
monitorozása -
„rizikó osztályok”**



MBL (metallo-béta-laktamáz), termelő nosocomialis kórokozók

- MBL: enzimek csoportja, amelynek tagjai képesek hidrolizálni a penicillineket, cephalosporinokat és karbapenemeket;
- Integronok hordozhatják ezeket a géneket – szerkezetükben, lokalizációjukban variabilitás
- In vitro igazolt a konjugációval történő átvitel – horizontális terjedés lehetőségének bizonyítása
- Megfigyelhető terjedése világszerte
- Kapcsolódó multirezisztencia – panrezisztencia

Pseudomonas aeruginosa (O11 és O12 szerotípus) – Libisch B. et al

Aeromonas hydrophila – Libisch B. et al

Acinetobacter baumannii

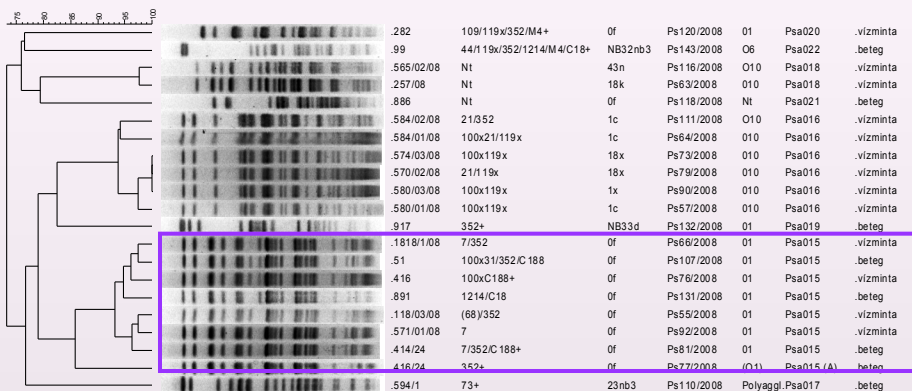
Klebsiella pneumoniae

Proteus mirabilis



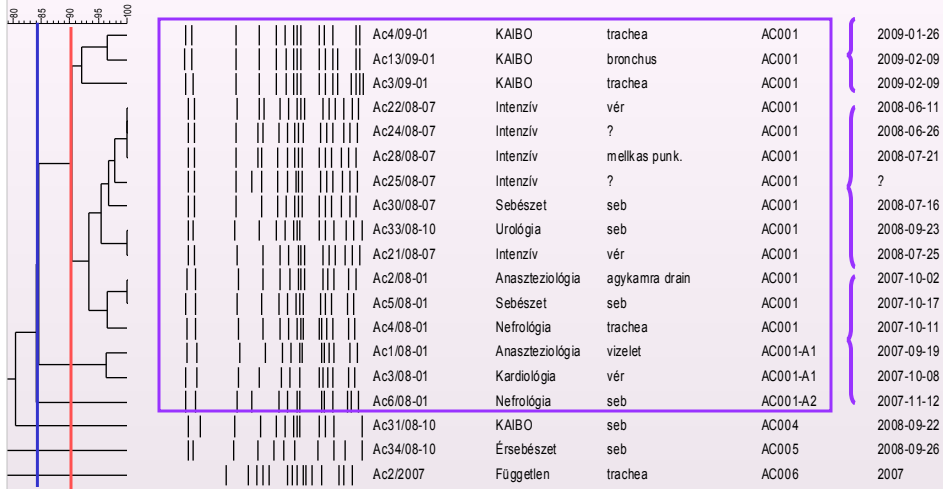
Multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* PFGE

Kórházi (ITO) csaptelepek monitorozásából (szűrővel és szűrő nélküli használat) származó *P. aeruginosa* törzsek PFGE vizsgálata (OKI Vízbakteriológiai osztállyal)





Multirezisztens *Acinetobacter* spp. törzsek retrospektív vizsgálata - PFGE



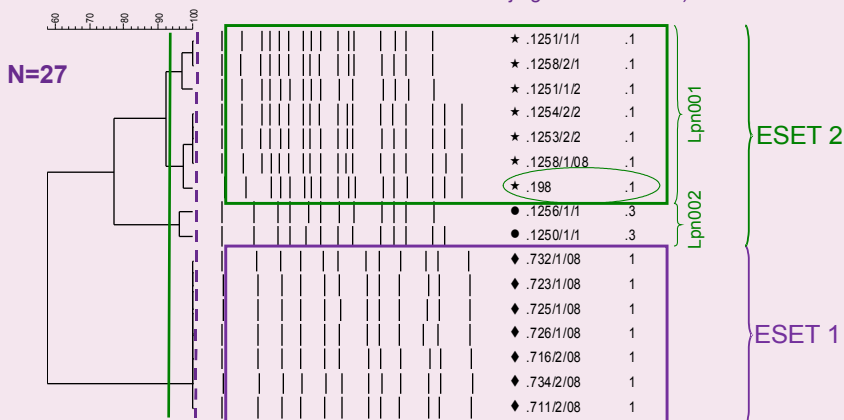


Legionella pneumophila

PFGE vizsgálat eredményei

Dice (Opt:1.00%) (Tol:1.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Legionella_9812 Legionella_9812

Vizsgálati módszer: kromoszóma restrikciós enzim emésztést követő PFGE (pulzálatott mezejű gélelektroforézis).





Köszönöm a figyelmet



Elérhetőségek:
paszti.judit@oek.antsz.hu
www.oek.hu