

***Streptococcus pneumoniae* v NRC pre pneumokokové nákazy**

Bottková E.¹, Klement C.¹, Maďarová L.¹, Čamajová J.¹, Avdičová M.¹,

Hupková H.², Hudečková H.³

¹*Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici*

²*Mikrobiologický ústav, LF UK, Bratislava*

³*Ústav verejného zdravotníctva, Jesseniova LF UK, Martin*

ABSTRAKT

Streptococcus pneumoniae je pôvodcom vážnych invazívnych infekcií, ktoré ohrozujú všetky vekové skupiny a predstavujú celosvetový problém týkajúci sa rôznych oblastí zdravotníctva. Očkovanie poskytuje ochranu proti najrizikovejším z viac ako 90 sérotypov pneumokokov, a vo forme konjugovaných vakcín je súčasťou povinného očkovania detí. V mnohých štúdiách bol zaznamenaný ich pozitívny vplyv na výskyt invazívnych pneumokokových ochorení (IPO) aj nosičstvo. Surveillance IPO a nadstavbovej diagnostike invazívnych izolátov pneumokokov sa na Slovensku venuje Národné referenčné centrum pre pneumokokové nákazy (NRC) od roku 2011. Systematické sledovanie sérotypov prebieha kontinuálne a výsledky sú priebežne hodnotené. Počas troch rokov činnosti sa NRC podieľalo na zdokonalení systému surveillance a sérotypizácie, zaviedlo do diagnostiky metódy molekulárnej biológie (multiplex PCR a pulznú elektroforézu), a v neposlednom rade vytvorilo vlastnú zbierku kmeňov *S. pneumoniae* izolovaných ako pôvodcov invazívnych ochorení. Údaje, na ktorých zhromažďovaní a vyhodnocovaní NRC do veľkej miery participuje, výrazne prispievajú k hodnoteniu vplyvu povinnej vakcinácie na Slovensku.

Kľúčové slová: *Streptococcus pneumoniae*. Národné referenčné centrum pre pneumokokové nákazy. Sérotypizácia. Vakcinácia.

Pneumokokové infekcie predstavujú v súčasnosti veľmi aktuálny problém, ktorý sa dotýka rôznych oblastí zdravotníctva. Ich pôvodca, *Streptococcus pneumoniae* (pneumokok), je významný humánný oportúnny patogén, schopný vyvolať závažné invazívne infekcie ako meningitída, sepsa alebo pneumónia spojená s bakteriémiou. Z menej závažných, no pomerne častých neinvazívnych infekcií, sú aktuálnym problémom najmä otitídy (infekcie stredného ucha) u malých detí. Vzniku pneumokokových infekcií predchádza kolonizácia nosohltanu, ktorá obvykle prebieha bez klinických ťažkostí. Približne 30-60% detí a 5-30% dospelých sú asymptomatickými nosičmi (Beran a kol., 2005; Bogaert a kol., 2004; Rawlings a kol., 2013). K šíreniu v populácii dochádza kvapôčkovou cestou a prispieva k nemu pobyt v kolektívoch. Vyššia chorobnosť je udávaná v zimných mesiacoch (AAP, 2003; Siráži a kol., 2009). Prevencia vo forme očkovania je dostupná len proti niektorým z 93 doposiaľ známych sérotypov pneumokokov, ktoré sú považované za rizikové a majú potenciál spôsobiť invazívne infekcie, prípadne sú spojené s rezistenciou na antibiotiká. Pre obzvlášť rizikovú skupinu detí do dvoch rokov je očkovanie zabezpečené pomocou konjugovaných vakcín. Na Slovensku je od roku 2009 vakcinácia proti pneumokokom súčasťou národného imunizačného programu, a teda patrí medzi povinné očkovania. V súčasnosti je dostupné očkovanie dvomi typmi konjugovaných vakcín:

- 1.) 10-valentným Synflorixom (GlaxoSmithKline) a
- 2.) 13-valentným Prevenarom13 (Pfizer).

Veková indikácia Prevenaru 13 bola len nedávno rozšírená na všetky vekové kategórie. Okrem konjugovaných vakcín je od roku 1996 dostupná aj polysacharidová vakcína, Pneumo 23 (Sanofi Pasteur), určená pre osoby staršie ako 2 roky.

Potreba komplexného sledovania invazívnych pneumokokových ochorení (IPO) v podmienkach celoplošnej vakcinácie vyústila do zriadenia Národného referenčného centra pre pneumokokové nákazy (NRC).

Hlavnou úlohou NRC je zabezpečenie a vykonávanie surveillance IPO. NRC bolo zriadené s účinnosťou od 1. januára 2011 na Regionálnom úrade verejného zdravotníctva so sídlom v Banskej Bystrici. V septembri toho istého roku, vstúpilo do platnosti Odborné usmernenie MZ SR na zabezpečenie surveillance pneumokokových invazívnych ochorení v Slovenskej republike (Vestník MZ SR 2011, Čiastka 19-31; ďalej len Odborné usmernenie) s cieľom zabezpečiť jednotný postup sledovania výskytu IPO v krajine. Ukladá povinnosť posielat' kmene izolované z fyziologicky sterilných miest do NRC na ďalšiu analýzu.

Po doručení klinického izolátu *S. pneumoniae* do NRC je zabezpečené druhové potvrdenie na základe kultivácie na krvnom agare, optochínového testu a rozpustnosti v žľči. Za rovnakým účelom je u niektorých izolátov vykonaná aj konvenčná PCR. NRC zároveň zabezpečuje aj nadstavbovú bakteriologickú diagnostiku, ktorá spočíva v stanovení sérotypu daného kmeňa.

Sérotypizácia v NRC je vykonávaná pomocou kombinácie metód – sérologických aj molekulárno-biologických. Medzi sérologické metódy patrí latexová aglutinácia a Neufeldova reakcia. Pri latexovej aglutinácii sa jedná o klasickú aglutináciu na nosiči, ktorá je realizovaná pomocou komerčne vyrábaných antisér (Statens Serum Institut, Dánsko). Je to spoľahlivá metóda, ktorú je však v niektorých prípadoch možné použiť len na čiastočnú sérotypizáciu. Jej rozsah je zameraný predovšetkým na sérotypy obsiahnuté v 23-valentnej polysacharidovej vakcíne. Za štandard v sérotypizačných metódach sa v súčasnosti považuje Neufeldova (quellung) reakcia.

Spočíva v reakcii špecifickej protilátky s polysacharidovým antigénom puzdra, v čoho dôsledku puzdro pneumokokov „napučíava“. Tento fenomén je možné pozorovať pomocou mikroskopu s fázovým kontrastom. Vyhodnotenie testu vyžaduje určitú prax, no metóda je spoľahlivá a je možné určiť pomocou nej všetky známe sérotypy. Zároveň ide o uznávanú a najpoužívanejšiu metódu na sérotypizáciu pneumokokov. Finančná náročnosť limituje dostupnosť a využitie tejto metódy.

Ďalšou sérotypizačnou metódou, ktorú NRC využíva je multiplexná PCR (polymerázová reťazová reakcia). Tá umožňuje identifikovať prítomnosť viacerých cieľových DNA sekvencií v rámci jedinej PCR. Je v oblasti sérotypizácie pneumokokov pomerne nová, no poskytuje v porovnaní s klasickými sérologickými metódami mnoho výhod ako napr. možnosť stanovenia sérotypu u neviabilných kmeňov, prípadne aj priamo v biologickom materiáli. Škála jej rozsahu je síce obmedzená, no pre sérotypizáciu vzoriek kmeňov z invazívnych ochorení, ktoré spôsobuje väčšinou určitá skupina sérotypov, je postačujúca. Zároveň poskytuje možnosti rôznych modifikácií, čo sú faktory, ktoré z nej robia veľmi komplexnú metódu. Niektoré genotypizačné metódy ako MLST (Multi Locus Sequence Typing) sú schopné poskytnúť komplexný a podrobný obraz o danom izoláte. Ide však o metódu technologicky a finančne náročnú.

NRC pre pneumokokové nákazy za 3 roky svojej existencie analyzovalo mnoho vzoriek kmeňov *S. pneumoniae* a vytvorilo vlastnú zbierku kmeňov – invazívnych aj neinvazívnych izolátov. Surveillance IPO na Slovensku síce prebieha dlhodobo, no vlastné sledovanie sérotypov pneumokokových kmeňov spôsobujúcich invazívne infekcie sa realizuje len od vzniku NRC. Veľkou mierou sa na efektívite a dôslednosti sledovania sérotypov zodpovedných za vznik IPO podieľalo Odborné usmernenie, nakoľko je veľmi dôležité, aby boli všetky izolované kmene ďalej analyzované a bol u nich stanovený sérotyp.

Aj u väčšiny vzoriek, u ktorých bol kultivačný záchyt negatívny, ale prítomnosť *S. pneumoniae* bola dokázaná iným spôsobom (dôkaz voľného antigénu, mikroskopia, PCR), je v súčasnosti možné v NRC stanoviť sérotyp. Nie všetky doručené vzorky pneumokokových kmeňov boli po doručení do NRC dostatočne viabilné, a teda nebolo možné získať živý kmeň. Takéto vzorky invazívnych izolátov sa vyskytli v rokoch 2011 a 2012 a nebolo možné u nich určiť sérotyp.

V roku 2013 sa taktiež vyskytlo niekoľko izolátov *S. pneumoniae*, ktoré nebolo možné v NRC opätovne vykultivovať, no u všetkých sa podarilo vďaka využitiu molekulárno-biologických metód sérotyp identifikovať (u niektorých len čiastočne).

Najčastejšie sa vyskytujúcimi sérotypmi ako za celkové obdobie tak aj v jednotlivých rokoch sú sérotypy 3 a 19A. V roku 2013 výraznejšie vystúpil počet kultivačne pozitívnych prípadov IPO spôsobených sérotypom 7F. NRC sa tiež podieľalo na koordinácii a zosúladení niektorých praktík týkajúcich sa doručovania kmeňov a transportu biologického materiálu, čo prispelo ku zdokonaleniu diagnostiky.

Veľká pozornosť sa na Slovensku, tak ako aj v iných krajinách, venuje povinnej vakcinácii, jej efektu na očkovanú populáciu (výskyt IPO, kauzálne sérotypy), ale aj na neočkovanú populáciu vplyvom kolektívnej imunity. Viaceré štúdie preukázali pozitívny vplyv očkovania nielen na výskyt IPO, ale aj na nosičstvo vakcinačných sérotypov (Black a kol., 2000; Lexau a kol., 2005). V súčasnosti sa však čoraz viac diskutuje aj o rôznych vplyvoch plošnej vakcinácie na zmeny v sérotypovej epidemiológii, ako sú „sérotypové nahradenie“ (serotype replacement) a „kapsulárne prepnutie“ (capsular switching). Pri sérotypovom nahradení sa v dôsledku vplyvu vakcinácie znižuje v očkovanej populácii výskyt vakcinačných sérotypov a na ich miesto sa dostávajú iné sérotypy - dochádza tak k zvýšeniu výskytu nevakcinačných sérotypov (Singleton a kol., 2007; Temime a kol., 2004).

Príkladom takejto udalosti je nárast IPO spôsobených sérotypom 19A po zavedení PCV 7 v USA u detí do 5 rokov (Hicks a kol., 2007). Pri kapsulárnom prepnutí dochádza u pneumokokov k expresii kapsulárneho antigénu iného sérotypu, ako bol ich pôvodný, no ostatné genetické vlastnosti zostávajú zachované. Po „prepnutí“ vakcinačného sérotypu na nevakcinačný môže byť takýto kmeň nositeľom rôznych vlastností ako napríklad rezistencia na antibiotiká a zároveň sa úspešne vyhne špecifickej imunite (Brueggemann a kol., 2007; Coffey a kol., 1991).

Obidve tieto udalosti sú veľmi závažnými faktormi, ktoré ovplyvňujú výskyt IPO u očkovanej aj neočkovanej populácie, a sú jedným z dôvodov na to, aby bola sledovaniu IPO a ich kauzálnych sérotypov venovaná dostatočná pozornosť.

Keďže na Slovensku neboli sérotypy spôsobujúce IPO pred zavedením vakcinácie sledované, jej vplyv sa bude hodnotiť ťažšie ako v krajinách, kde ich sledovanie prebiehalo niekoľko rokov pred zavedením povinného očkovania. NRC a jeho činnosť je možné s prehľadom datovať od začiatku roku 2011, no systematické sledovanie sérotypov spôsobujúcich invazívne infekcie približne až od septembra 2011 (uplatnenie Odborného usmernenia a s ním spojené povinné posielanie invazívnych izolátov). Získavanie informácií týkajúcich sa kmeňov *S. pneumoniae* spôsobujúcich IPO na Slovensku je jedna z najdôležitejších činností NRC. Hodnotenie výskytu IPO, vplyvu vakcinácie na výskyt IPO a zloženie kauzálnych sérotypov je však kontinuálna aktivita vyžadujúca dlhodobé úsilie. Kvalitná diagnostika, vysoká úroveň hlásení a spolupráca všetkých zložiek podieľajúcich sa na jednotlivých činnostiach je preto kľúčovou pri získavaní relevantných údajov.

LITERATÚRA

1. BLACK, S., SHINEFIELD, H., FIREMAN, B., LEWIS, E., RAY, P., HANSEN, J.R., ELVIN, L., ENSOR, K.M., HACKELL, J., SIBER, G., MALINOSKI, F., MADORE, D., CHANG, I., KOHBERGER, R., WATSON, W., AUSTRIAN, R., EDWARDS, K. 2000. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J.* 19: 187–195.
2. American Academy of Pediatrics (AAP) [Pneumococcal Infections]. 2003. In: Pickering L.K. ed. 2003. Red Book: 2003 Report of the Committee on Infectious Diseases. 26 vyd. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics. 927 s. ISBN 1-58110-095-7.
3. BERAN, J., HAVLÍK, J., VONKA, V. 2005. *Očkování - Minulost, přítomnost, budoucnost*. 1. vyd. Praha: Galén. 348 s. ISBN 80-7262-361-3.
4. BOGAERT, D., DE GROOT, R., HERMANS, P.W. 2004. Streptococcus pneumoniae colonization: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* 4:144-154.
5. BRUEGGEMANN, A.B., PAI, R., CROOK, D.W., BEALL, B. 2007. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* 3: e168. doi:10.1371/journal.ppat.0030168.
6. COFFEY, T.J., DOWSON, C.G., DANIELS, M., ZHOU, J., MARTIN, C., SPRATT, B.G., MUSSER, J.M. 1991. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 5: 2255–2260.
7. HICKS, L.A., HARRISON, L.H., FLANNERY, B., HADLER, J.L., SCHAFFNER, W., CRAIG, A.S., JACKSON, D., THOMAS, A., BEALL, B., LYNFIELD, R., REINGOLD, A., FARLEY, M.M., WHITNEY, C.G. 2007. Incidence of pneumococcal

disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998–2004. *J Infect Dis.* 196: 1346-1354.

8. LEXAU, C.A., LYNFIELD, R., DANILA, R., PILISHVILI, T., FACKLAM, R. 2005. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease among older adults in the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine. *JAM* 294: 2043-2051, doi: 10.1001/jama.294.16.2043.

9. RAWLINGS, B.A., HIGGINS, T.S., HAN, J.K. 2013. Bacterial pathogens in the nasopharynx, nasal cavity, and osteomeatal complex during wellness and viral infection. *Am J Rhinol Allergy.* 27: 39-42. doi: 10.2500/ajra.2013.27.3835.

10. SIRÁGI, P., KLEMENT, C., MEZENCEV, R., MAĎAROVÁ, L., KISSOVÁ, R., STRHÁRSKY, J., TRENKLER, J., KOHÚTOVÁ, D., NOVÁKOVÁ, E., HUPKOVÁ, H., TRUPL, J. 2009. In: Klement C. a kol. 2009. Medzinárodné zdravotné predpisy - teória, legislatíva, implementácia, súvislosti. 1. vyd. Banská Bystrica: PRO. 438 s. ISBN 978-80-89057-24-5.

11. SINGLETON, R.J., HENNESSY, T.W., BULKOW, L.R., HAMMITT, L.L., ZULZ, T., HURLBURT, D.A., BUTLER, J.C., RUDOLPH, K., PARKINSON, A. 2007. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA.* 297: 1784-1792.

12. TEMIME, L., GUILLEMOT, D., BOËLLE, P.Y. 2004. Short- and long-term effects of pneumococcal conjugate vaccination of children on penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 2206–2213.

Adresa autora:

RNDr. Edita Bottková

Regionálny úrad verejného zdravotníctva

Cesta k nemocnici 25

975 56 Banská Bystrica