

EREDETI KÖZLEMÉNY

A CHLAMYDIA TRACHOMATIS UROGENITÁLIS SZEROTÍPUSAINAK ELŐFORDULÁSA HAZÁNKBAN

LEVELEZÉSI CÍM

Petrovay Fruzsina
petrovay.fruzsina@oek.antsz.hu

A szerzők *Journal of Medical Microbiology*
(2009; Vol. 58, 760-764 old.) c. nemzetközi
folyóiratban megjelent tudományos
közleménye alapján

PREVALENCE OF UROGENITAL CHLAMYDIA TRACHOMATIS SEROVARS IN HUNGARY

PETROVAY FRUZZSINA¹, BALLA ESZTER DR.¹, NÉMETH ISTVÁN², GÖNCZÖL ÉVA DR.³

¹Országos Epidemiológiai Központ, II. Bakteriológia osztály, Budapest (osztályvezető: Dr. Herpay Mária)

²Richter Gedeon NyRt, Fejlesztési Gyógyszermetabolizmus és Farmakokinetika Osztály, Budapest

³Országos Epidemiológiai Központ, Virologiai Főosztály, Budapest

ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánkban az egyes *Chlamydia trachomatis* szerotípusok előfordulása és gyakorisága vonatkozásában nincsenek korábbi szakirodalmi adatok. A tanulmány célja egy magas rizikócsoportot képviselő prostituált populációban előforduló *C. trachomatis* szerotípusok azonosítása volt egy genotipizáló metodika alkalmazásával. Összesen 484 prostituált endocervikális mintájának vizsgálatára került sor. A *C. trachomatis* pozitív mintákból az egyes szerotípusok azonosítása egy PCR alapú RFLP genotipizáló technikával történt. Az eredmények alapján 32 esetben sikerült kimutatni a kórokozó DNS-ét. A *C. trachomatis* fertőzés prevalenciája 6,6% volt, amelyet korcsoportos bontásban vizsgálva a 20 év alattiak körében bizonyult a legmagasabbnak. A pozitív mintákban a baktérium hét különböző szerotípusát sikerült azonosítani. A leggyakoribbnak a D (34,4%) szerotípus bizonyult, ezt követték csökkenő prevalencia sorrendben az E (21,9%), F (18,8%) G (9,4%), J (9,4%), H (3,1%), I (3,1%) szerotípusok. Hazánkban – más külföldi adatokkal összhangban – a leggyakoribbaknak a D, E és F szerotípusok mutatkoztak, amely a pozitív minták 75%-át tették ki. Ez az RFLP analízis alapú genotipizáló technika további epidemiológiai felmérésekben, az egyes populációkban keringő *C. trachomatis* szerotípusok prevalenciájának meghatározásához és a diagnosztikában is segítséget nyújthat.

KULCSSZAVAK: *Chlamydia trachomatis*, genotipizálás, MOMP

RÖVIDÍTÉSEK: MOMP: major outer membrane protein, PCR: polimeráz láncreakció, RFLP: restriction fragment length polymorphism

SUMMARY

The distribution of different *Chlamydia trachomatis* serovars in Hungary has not been reported previously. The objective of this study was to determine the distribution and prevalence of *C. trachomatis* serovars in a high-risk population by genotyping. Endocervical specimens of 484 female sex workers were screened for *C. trachomatis* by plasmid PCR. Genotyping was performed in all *C. trachomatis* positive samples by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of the *omp1* gene. A total of 32 (6.6%) specimens were positive for *C. trachomatis*. Age was an important risk factor for *C. trachomatis* infection in female sex workers. The highest prevalence was detected in women under age 20 (18.8%). All positive specimens were successfully genotyped and seven different serovars were identified. The most prevalent was serovar D (34.4%), followed by E (21.9%), F (18.8%), G (9.4%), J (9.4%), H (3.1%), and I (3.1%) respectively. A heterogeneous distribution of *C. trachomatis* serovars was observed in the study group, where the most common serovars were D, E, and F comprising 75% of the positive samples. The PCR-based RFLP method can be used in epidemiological studies on the prevalence of *C. trachomatis* infection to provide more information and to compare the serovar distribution among different cohorts.

KEY WORDS: *Chlamydia trachomatis*, genotyping, MOMP

BEVEZETÉS

A *C. trachomatis* immundomináns antigén tulajdonságú, sejt felszíni membránproteinje, a MOMP (major outer membrane protein) tipizálása révén a kórokozó 15 alap szerotípusát különítették el (1). A *C. trachomatis* MOMP antigénjét kódoló *omp1* gén négy variábilis szekvenciájú doménből és az ezek közt elhelyezkedő öt konstans doménből áll. A variábilis domének szek-

vencia polimorfizmusából eredő, eltérő aminosav összetételű MOMP antigének felelősek a különböző *C. trachomatis* szerotípusok létrejöttéért.

Az egyes szerotípusok az általuk okozott kórképek szerint csoportosíthatóak. A trachoma kialakulásáért felelős A-C szerotípusok a trópusi égövön endemikusan fordulnak elő, ezeken a területeken a vakság kialakulá-

sának legfőbb kóroki tényezői (2). A legnagyobb csoport, a világszerte elterjedt D-K szerotípusok urogenitális és újszülöttkori infekciókat okoznak. A három L (1-3) szerotípus a trópusi, szubtrópusi területeken előforduló szisztémás megbetegedés, a lymphogranuloma venereum (LGV) kialakulásáért felelősek, amely a közelmúltban Nyugat-Európában is felbukkant járványzerűen homoszexuális férfiak között (3).

Az egyes *C. trachomatis* szerotípusokat korábban poliklonális és monoklonális ellenanyagokkal tipizálták, a molekuláris módszerek fejlődésével azonban a gyorsabb és költséghatékonyabb genotipizáló módszerek kerültek előtérbe. Napjainkban a leggyakrabban alkalmazott genotipizáló technikák a génszekvenálás és a PCR alapú restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (RFLP) analízis. Mindkét módszer esetében az *omp1* gén PCR amplifikációját követően a kapott PCR termék tipizálása történik (4-9). A *C. trachomatis* szerotípusok meghatározása elsősorban epidemiológiai felmérésekhez nyújt segítséget. A genotipizáló metodikákat emellett klinikai vizsgálatokban, az egyes szerotípusok okozta fertőzések és a klinikai tünetek közötti összefüggések, valamint a szerotípusok patogenitásbeli eltéréseinek kutatásában alkalmazzák (7-8, 10-11). Az Európában azonosított LGV megbetegedések növekvő fontosságú egészségügyi problémát jelentenek. Ennek diagnosztikája során az L1-3 szerotípusok a gyakori urogenitális D-K szerotípusoktól történő elkülönítésében egyedül a genotipizálás nyújthat segítséget.

Hazánkban az egyes urogenitális *C. trachomatis* szerotípusok előfordulásával és gyakoriságával kapcsolatban nincsenek magyar vonatkozású adatok. A tanulmány célja a *C. trachomatis* szerotípusok elkülönítésére alkalmas genotipizáló metodika beállításával egy magas rizikócsoportot képviselő populációban előforduló szerotípusok azonosítása volt.

BETEGANYAG ÉS MÓDSZER

KLINIKAI MINTÁK ÉS DNS KIVONÁS

Budapesten és környékén 2006. január és július között végzett anonim STD-szűrés során 484 prostituált endocervixéből, steril Dacron végű pálcával levett mintáinak vizsgálata készült el.

A mintavevő pálcákat Chlamydia transport médiumot tartalmazó Eppendorf csövekbe helyezve áztattuk, majd ezeket a DNS kivonási lépésig a pálcák eltávolítása után -20°C-on tároltuk. A DNS izolálás egy kereskedelmi forgalomban kapható DNS tisztító kittel (High Pure DNA Template Preparation Kit, Roche Diagnostics) történt a használati utasítás szerint. A kivont DNS-t tartalmazó mintákat -20°C-on a további vizsgálatokig tároltuk.

C. TRACHOMATIS KIMUTATÁS

A cervix mintákból első lépésként a *C. trachomatis* DNS-t tartalmazókat azonosítottuk. A mintákban a

C. trachomatis DNS kimutatására beállított PCR vizsgálat célszekvenciája a kórokozó extrakromoszómális plazmidján egy 495 bázispárnyi (bp) génszakasz volt.

A DNS kivonást követően a mintákban esetlegesen megmaradó PCR inhibitorok jelenlétének ellenőrzése céljából, az álnegatív *C. trachomatis* PCR eredmények kizárása érdekében a mintákat a humán β -globin génre beállított PCR vizsgálaton is lefuttattuk.

GENOTIPIZÁLÁS

Az egyes *C. trachomatis* szerotípusok elkülönítését egy PCR alapú restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (RFLP) analízisen alapuló genotipizáló technikával végeztük. Ezzel a módszerrel az *omp1* gén PCR amplifikációját követően a kapott PCR termék szekvenciájának restrikciós enzimatis hasításával tipizálható a vizsgált *C. trachomatis* DNS minta. A *C. trachomatis* plazmid PCR-rel detektált pozitív minták először a MOMP fehérjét kódoló *omp1* génre tervezett seminested PCR vizsgálaton lettek lefuttatva (5). A keletkezett, körülbelül 1070 bp hosszú PCR termékek detektálása 1%-os agaróz gélen történt.

Az RFLP analízis során ezt követően az *omp1* PCR termékének restrikciós emésztését először az *AluI* restrikciós endonukleáz (Promega) enzimmel végeztük. A *C. trachomatis* szerotípusok restrikciós mintázatainak detektálása 1,5%-os agaróz gélen gélelektroforézissel készült. Az azonos *AluI* restrikciós mintázatot adó, úgynevezett C-csoportba tartozó szerotípusokat a *HinfI*, *EcoRI*, *DdeI* (Promega) restrikciós endonukleázok felhasználásával különítettük el. A D szerotípusok variánsainak elkülönítése a *CfoI* (Promega) enzimmel történt.

A vizsgálatokhoz referencia kontrollként felhasznált, *C. trachomatis* törzsekből tisztított DNS mintákat Dr. Hamid Jalal és munkatársai (Addenbrook's Kórház, Cambridge, Anglia) bocsátották rendelkezésünkre. A *C. trachomatis* törzseket és a DNS kivonási procedúrát egy általuk korábban közölt tanulmányban írták le (12).

STATISZTIKAI ANALÍZIS

A prostituáltak életkor adatainak elemzése SAS 9.1 program használatával zajlott. Az életkor és a *C. trachomatis* pozitivitás közötti összefüggés vizsgálatához logisztikus regressziót alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

C. TRACHOMATIS ELŐFORDULÁSA A MINTÁKBAN

A 484 endocervikális mintából *C. trachomatis* plazmid PCR vizsgálattal 32 (6,6%) esetben sikerült kimutatni a kórokozó DNS-t. Külső kontrollként az inhibitorok jelenlétét ellenőrző β -globin PCR mindegyik minta esetében működött, gátlás nem volt detektálható.

A *C. trachomatis* fertőzés és az életkor közötti összefüggés vizsgálatára összesen 275 prostituált életkor adata állt rendelkezésre. Ebbe a csoportba tartozók

1. táblázat. Pozitív *C. trachomatis* eredmények és az életkor közötti összefüggés ($n = 275$)

KORCSPORTOK*	MEGFIGYELT ÉRTÉKEK		PREDIKCIÓ†	
	POZITÍV MINTÁK (n)	(%)	(%)	CI 95%
<20	3/16	18,8	31,0	24,5–37,4
20–29	17/180	9,4	10,0	7,3–12,7
30–39	3/62	4,8	2,6	1,8–3,4
40–49	0/13	0,0	0,6	0,4–0,8
>50	0/4	0,0	0,2	0,1–0,2
Összesen	23/275	8,4	8,9	5,3–12,4

* 209 nő esetében nincs életkor adat † Életkor hatása: $p < 0.001$

életkora 18–59 év közötti, az átlag életkoruk 27,5 év volt. A *C. trachomatis* fertőzés és az életkor között szignifikáns összefüggés volt kimutatható, a fiatalabb nőkben a *C. trachomatis* prevalenciája magasabb értéket mutatott (1. táblázat).

GENOTÍPIZÁLÁS

A genotípezés első lépéseként a *C. trachomatis* pozitív minták *omp1* PCR vizsgálattal zajló amplifikációja mind a 32 minta esetében sikeres volt. Az RFLP analízissel hét különböző urogenitális *C. trachomatis* szerotípust sikerült elkülöníteni, melyek a kontroll törzsekkel megegyező restrikciós mintázatot adtak.

Az *AluI* hasítással a C-csoportba tartozó szerotípusok kivételével, restrikciós mintázatuk alapján a D, E, F és G szerotípusokat sikerült elkülöníteni (1. ábra). A C-csoportba tartozó szerotípusok további szétválasztása során az *EcoRI* hasítási lépéssel a C, H, I, J szerotípu-

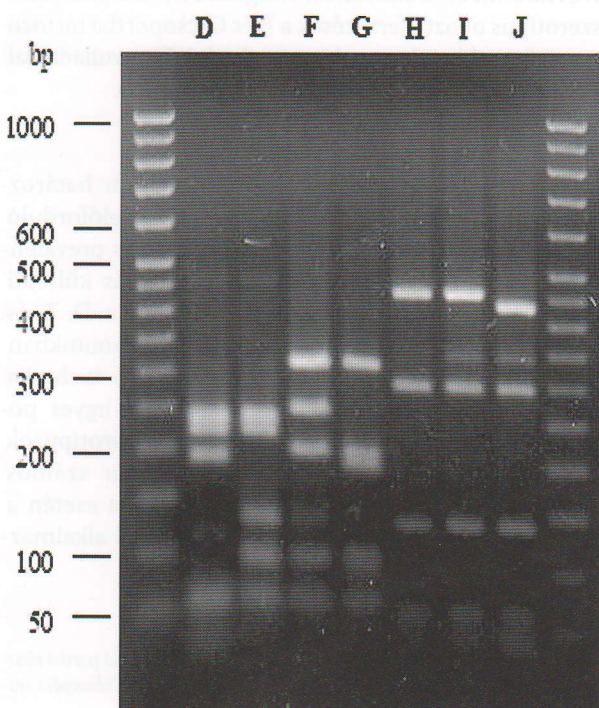
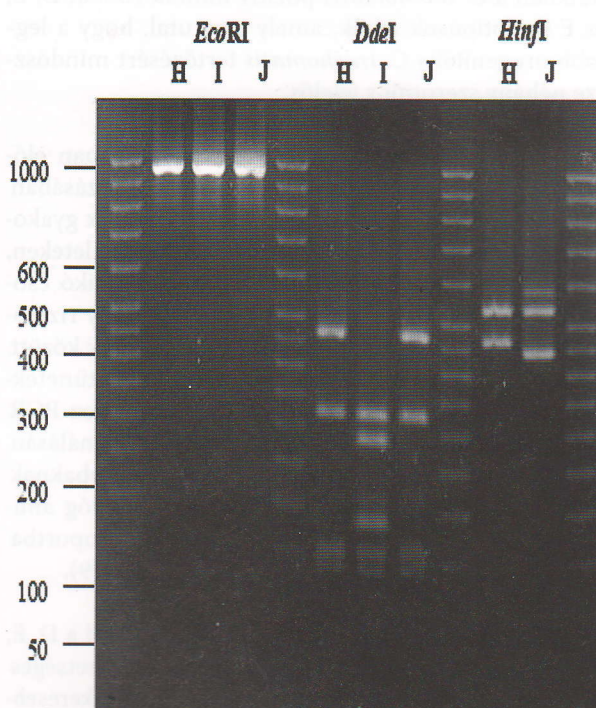
soktól elkülöníthető az L3, a *DdeI* hasítási lépéssel az I szerotípus, végül a *HinfI* hasítási lépéssel a C, H, J szerotípusok (2. ábra). Az *AluI* hasítás eredményeként D szerotípusként azonosított mintákat *CfoI* restrikciós endonukleáz emésztéssel tovább vizsgálva egy minta adott eltérő restrikciós mintázatot, amely az úgynevezett D– variánsnak felelt meg.

Összességében a D szerotípus mutatkozott a leggyakoribbnak (11/32, 34,4%). A többi szerotípus prevalenciája csökkenő sorrendben a következő volt: E (7/32, 21,9%), F (6/32, 18,8%), G (3/32, 9,4%), J (3/32, 9,4%), H (1/32, 3,1%) és I (1/32, 3,1%).

MEGBESZÉLÉS

C. TRACHOMATIS PREVALENCIÁJA

A szexuális úton terjedő infekciók, ezen belül is a *C. trachomatis* fertőzés tekintetében a prostituáltak magas rizikójú csoportot képviselnek. A rendszertelen óv-

1. ábra. *C. trachomatis* szerotípusok *AluI* enzimatis hasítással kapott restrikciós mintázatai2. ábra. *EcoRI*, *DdeI*, *HinfI* enzimatis hasítással kapott restrikciós mintázatok

szerhasználat, a partnerek nagy száma, az intravénás droghasználat a fertőzések rizikófaktorainak számítanak. A vizsgált populációban a *C. trachomatis* fertőzés előfordulása tekintetében 6,6%-os prevalencia értéket tapasztaltunk, amely jól korrelál más európai országokban prostituáltak körében elvégzett hasonló felmérések eredményeivel. A *C. trachomatis* DNS kimutatásán alapuló európai közlemények adatai szerint prostituáltak körében a *C. trachomatis* fertőzés 10% alatti prevalenciája figyelhető meg (Belgium 7,3%; Csehország 5,5%; Németország 9,6%; Görögország 5,9%; Spanyolország 5,9%; Egyesült Királyság 8,2%) (13-18).

A vizsgált populáció életkora és a *C. trachomatis* fertőzés prevalenciája között szignifikáns összefüggés volt kimutatható. A prevalencia értéke fordítottan volt arányos az életkorral, fiatalabb nők körében magasabb volt a *C. trachomatis* fertőzöttség aránya, amely alátámasztja azt a tényt, mely szerint az életkor a *C. trachomatis* fertőzés egyik rizikófaktor. Az itt vizsgált populációban, miután a rendszeres és gyakori partnerváltás feltételezhetően mindegyik korcsoportra jellemző, a jelenségre a biológiai folyamatok adhatnak magyarázatot, idősebbekben az immunológiai érettebb cervikális nyálkahártya reinfekció esetén gyorsabban és hatékonyabban küzd le a fertőzést (19).

C. TRACHOMATIS GENOTÍPIZÁLÁSA

A vizsgált prostituált populációban a *C. trachomatis* szerotípusok változatos eloszlást mutattak. Hét különböző urogenitális szerotípust sikerült azonosítani, a három leggyakoribb szerotípus a D (34,4%), E (21,9%), és F (18,8%) volt, a kevésbé gyakoriak a G (9,4%), J (9,4%), H (3,1%) és I szerotípusok (3,1%). A vizsgálatunkban a *C. trachomatis* pozitív minták 75%-át D, E, és F szerotípusok adták, amely arra utal, hogy a legtöbb urogenitális *C. trachomatis* fertőzésért mindössze néhány szerotípus felelős.

Számos külföldi tanulmányban a leggyakrabban előforduló *C. trachomatis* szerotípusok vonatkozásában hasonló eredmények születtek. A szerotípusok gyakoriságát egyes tanulmányok eltérő földrajzi területeken, különböző populációkban, például magas rizikó csoportot képviselő prostituáltak között, alacsony rizikó csoportba tartozó terhes nőkben, STD betegek között nemek szerinti megoszlásban, vagy a klinikai tünetekkel összehasonlítva is vizsgálták. A tipizáláshoz PCR alapú RFLP analízist, vagy *omp1* gén szekvenálásán alapuló technikát alkalmaztak, a leggyakoribbaknak ezekben a vizsgálatokban is a D, E és homológ aminosav szekvenciájuk alapján az ún. átmeneti csoportba tartozó F vagy G szerotípusok mutatkoztak (4-9).

A *C. trachomatis* urogenitális szerotípusai közül a D, E, F/G szerotípusok gyakoribb előfordulásának lehetséges magyarázata lehet, hogy ezek a szerotípusok sikeresebben kerülnek meg az immunrendszerrel, ezáltal hosszabb ideig képesek perzisztálni, illetve eltérő virulenciával

rendelkezhetnek. Ito és munkatársai által kidolgozott egérmodellben a vizsgált szerotípusok közül a D és E szerotípus hosszabb perzisztáló képességet mutatott. Ugyanebben a tanulmányban a D és H szerotípusok virulenciáját összehasonlítva a D szerotípus sokkal invazívabbnak bizonyult (20). Lysén és munkatársai a *C. trachomatis* izolátumok *omp1* gén szekvenálással történő tipizálásával a D szerotípuson belül találták a legnagyobb szekvencia heterogenitást (7). A D szerotípus genetikai diverzitásában megfigyelt nagyfokú variabilitás elősegítheti ennek a szerotípusnak a specifikus immunválasz hatékony megkerülését és gyakoribb előfordulását.

Az E szerotípus prevalenciája sok tanulmányban a legmagasabb (4, 9, 21). Az E szerotípust összefüggésbe hozzák a tünetmentes és perzisztáló *C. trachomatis* fertőzésekkel (4, 8, 10). Az E szerotípus *omp1* szekvencia variabilitása azonban a többi szerotípushoz képest alacsonyabb (7, 21). A stabilitás magyarázata és a gyakori előfordulás oka az lehet, hogy ez a szerotípus kevésbé immunogén, ebből adódóan az immunológiai szelekció hatása is kisebb mértékű, amely a többi szerotípussal szemben terjedési előnyt jelent.

Az F szerotípusok terjedési sikerének oka hasonlóan a kisebb mértékű immunogenitásban keresendő. Van Duynhoven és munkatársai tanulmányukban az átmeneti csoportba tartozó F és G szerotípusok nagyobb előfordulási gyakoriságát tapasztalták olyan nők körében, akiknek alhasi fájdalommal járó, PID gyanúját felvető tünetei voltak (11). Az F/G szerotípusok az alsó genitális traktusban feltehetően enyhe lefolyású fertőzést okoznak és a subklinikus fertőzést követően átterjedhetnek a kismedencébe. Ezt a hipotézist támasztja alá Workowski és munkatársai vizsgálata is, amelyben az F szerotípus okozta fertőzések a B és C-csoportba tartozó szerotípusokhoz képest kismértékű lokális gyulladással és fluorral járó, enyhe tüneteket okoztak (22).

ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarországon ismereteink szerint először határoztuk meg egy magas kockázati csoportban előforduló *C. trachomatis* szerotípusok megoszlását és prevalenciáját. A leggyakoribb szerotípusoknak más külföldi tanulmányokhoz hasonlóan hazánkban is a D, E és F szerotípusok mutatkoztak. A laboratóriumunkban beállított RFLP analízis alapú genotipizáló technika további epidemiológiai vizsgálatokban, az egyes populációkban cirkuláló *C. trachomatis* szerotípusok azonosítására, valamint az Európában már számos országban felbukkanó LGV klinikai gyanúja esetén a differenciáldiagnosztika módszereként is jól alkalmazható molekuláris metodika.

IRODALOM

1. Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1981; 31:1161-1176.
2. Thylefors B, Négrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. Bull World Health Organ 1995; 73:115-121.