

## Η επιδημιολογία της πνευμονικής φυματίωσης σε ασθενείς δύο νοσοκομείων της Αθήνας

**ΣΚΟΠΟΣ** Παρά τη μεγάλη σημασία και τη σχετικά πρόσφατη ανάδυση της νόσου παγκόσμια, η επιδημιολογία της πνευμονικής φυματίωσης στους ενήλικες παραμένει άγνωστη στην Ελλάδα. Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη μεγάλου αριθμού ασθενών που διαγνώστηκαν με φυματίωση στα δύο μεγαλύτερα πνευμονολογικά νοσοκομεία της Αθήνας και ο έλεγχος των αντίστοιχων στελεχών. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Καταγράφηκαν δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα 250 διαδοχικών ασθενών, που νοσηλεύτηκαν με φυματίωση στα νοσοκομεία «Σωτηρία» και «Σισμανόγλειο» και εξετάστηκαν τα αντίστοιχα στελέχη *Mycobacterium tuberculosis* ως προς την αντοχή τους σε 5 αντιφυματικά φάρμακα. Σε όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν στο «Σωτηρία» και σε επιβεβαιωμένα στελέχη του «Σισμανόγλειο» διενεργήθηκε γονοτυπική ανάλυση με τη μέθοδο *mycobacterial interspersed repeat unit (MIRU)*. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Οι περισσότεροι ασθενείς ήταν άνδρες (75,6%), κατοικούσαν στην Αττική (76%), εμφάνιζαν πνευμονική φυματίωση (90,8%) και είχαν θετική Μαντουχ (86,1%) και άμεση οξεάντοχη χρώση (73,2%), ενώ 46,8% εμφάνιζαν χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο. Οι αλλοδαποί αντιπροσώπευαν υψηλό ποσοστό των ασθενών (31,2%). Καταγράφηκαν γνωστοί παράγοντες κινδύνου (χρόνια νόσος 27,6%, ανοσοκαταστολή 9,6%, κατάχρηση ουσιών 11,2%, ιδρυματοποίηση 7,6%), ενώ 11,2% των ασθενών ανέφεραν φυματίωση στο παρελθόν (οι μισοί δεν ολοκλήρωσαν την ενδεικνυόμενη θεραπεία). Οι αλλοδαποί παρουσίαζαν συχνότερα χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο (66,7% και 37,8%, αντίστοιχα,  $P < 0,001$ ) και κατοικούσαν συχνότερα στην Αττική (89,7% και 69,8%, αντίστοιχα,  $P = 0,001$ ). Αντίθετα, οι Έλληνες ανέφεραν συχνότερα χρόνια νόσο (36% και 9%, αντίστοιχα,  $P < 0,001$ ) και ανοσοκαταστολή (11,1% και 6,4%, αντίστοιχα,  $P = 0,025$ ), είχαν μεγαλύτερο μέσο όρο ηλικίας ( $56,8 \pm 18,3$  και  $34,0 \pm 10,3$  έτη, αντίστοιχα,  $P < 0,001$ ) και παρουσίαζαν δικόρυφη κατανομή ηλικίας, χαρακτηριστική της συνεχιζόμενης μετάδοσης της φυματίωσης στην κοινωνία. Τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής αφορούσαν στην ισονιαζίδη (14,4%) και τη στρεπτομυκίνη (23,6%). Πολυανθεκτική φυματίωση ανιχνεύτηκε στο 3,5% των Ελλήνων και στο 15% των ασθενών που προέρχονταν από χώρες της Ανατολικής Ευρώπης ( $P = 0,012$ ) και συσχετίστηκε με προηγούμενο ιστορικό φυματίωσης ( $P < 0,001$ ). Σε σύνολο 147 στελεχών του Νοσοκομείου «Σωτηρία» ταυτοποιήθηκαν 145 διακριτοί γονότυποι, από τους οποίους δύο αποτελούσαν ομάδες (δύο στελέχη η καθεμιά). Η γονοτυποποίηση όλων των στελεχών που απομονώθηκαν από ιδρυματοποιημένους ασθενείς είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση επιδημικής έξαρσης ενός κλώνου *M. tuberculosis*, η οποία αφορούσε σε 7 ασθενείς που προέρχονταν από 3 ψυχιατρικές κλινικές της Αθήνας. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Για πρώτη φορά προσδιορίζεται η επιδημιολογία της πνευμονικής φυματίωσης σε ενήλικες ασθενείς και τεκμηριώνεται επιδημική έξαρση φυματίωσης στην Ελλάδα.

Η φυματίωση αποτελεί παγκόσμια μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, δεδομένου ότι το ένα τρίτο του πληθυ-

μού της γης έχει μολυνθεί από το *Mycobacterium tuberculosis* και επομένως βρίσκεται σε κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου.<sup>1</sup> Μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980, η επίπτωση της νόσου παρουσίαζε ελάττωση στις αναπτύ-

\*Δ. Χούχουλα,<sup>1</sup>  
\*Ν. Σκαρμούτσου,<sup>1,2</sup>  
Ε. Φαβίου,<sup>3</sup>  
Ε. Φακίρη,<sup>2</sup>  
Σ. Νικολάου,<sup>3</sup>  
Χ. Βηέτσας,<sup>2</sup>  
Β. Ταμβάκης,<sup>3</sup>  
Ε. Παπαφράγκας,<sup>2</sup>  
Σ. Καναβάκη,<sup>3</sup>  
Γ. Βουρλή,<sup>1</sup>  
Π.Θ. Τάσιος,<sup>1</sup>  
Ν. Λεγάκης,<sup>1</sup>  
Λ. Ζέρβα<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα  
<sup>2</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, «Σισμανόγλειο» Νοσοκομείο, Αθήνα  
<sup>3</sup>Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων, Νοσοκομείο «Σωτηρία», Αθήνα

### Epidemiology of pulmonary tuberculosis among patients of two hospitals in Athens

Abstract at the end of the article

#### Λέξεις ευρητηρίου

Αντοχή  
Αττική  
Γονοτυποποίηση  
Επιδημιολογία  
Φυματίωση

Β' Βραβείο  
Επαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης», 2005

\* Οι δύο πρώτοι συγγραφείς συνεισέφεραν το ίδιο στη μελέτη

γμένες χώρες, γεγονός που οδήγησε στην αισιόδοξη πρόβλεψη εξάλειψης της φυματίωσης στις επόμενες δεκαετίες, τουλάχιστον στις χώρες αυτές.<sup>2</sup> Αντί γι' αυτό, διάφορες αιτίες, μεταξύ των οποίων και η παραμέληση των κρατικών προγραμμάτων επιδημιολογικής επιτήρησης, πρόληψης και θεραπείας, οδήγησαν στην αύξηση της συχνότητας της φυματίωσης, στην εμφάνιση επιδημικών εξάρσεων και στην εξάπλωση πολυανθεκτικών στελεχών, τα οποία ορίζονται ως ανθεκτικά τουλάχιστον στην ισονιαζίδη και τη ριφαμπικίνη.<sup>1-3</sup>

Η απειλητική ανάπτυξη της φυματίωσης συνέπεσε χρονικά με τη μεγάλη ανάπτυξη των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων. Η εφαρμογή τους στην επιδημιολογία είχε καθοριστική σημασία όχι μόνο για την κατανόηση της μετάδοσης της φυματίωσης, αλλά και για τον έλεγχο της νόσου. Η επιβεβαίωση της μετάδοσης, η αναγνώριση επιδημικών εξάρσεων, η διάκριση της εργαστηριακής επιμόλυνσης, η διαφοροποίηση μεταξύ αναζωπύρωσης της νόσου και της λοίμωξης από νέο στέλεχος και, τελευταία, η αναγνώριση λοίμωξης από περισσότερους του ενός κλώνους, κατέστησαν δυνατά χρησιμοποιώντας τις τεχνικές της μοριακής επιδημιολογίας.<sup>4</sup> Η τεχνική που εφαρμόστηκε βασίστηκε κυρίως στη μέθοδο ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους με ένζυμα περιορισμού (restriction fragment length polymorphism, RFLP) του IS6110, που βρίσκεται σε διαφορετικό αριθμό αντιγράφων και σε διαφορετική θέση στο γονιδίωμα του συμπλέγματος του *M. tuberculosis*.<sup>5</sup> Ωστόσο, η πρότυπη αυτή μέθοδος παρουσιάζει μειονεκτήματα. Στελέχη με λιγότερα από έξι αντίγραφα δεν τυποποιούνται, ενώ απαιτείται μεγάλη ποσότητα DNA και επομένως χρονοβόρες καλλιέργειες. Γι' αυτούς τους λόγους, εφαρμόστηκαν τεχνικές που πολλαπλασιάζουν τα νουκλεϊνικά οξέα, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), ώστε να επιταχυνθεί η λήψη των αποτελεσμάτων και να απλοποιηθεί η μεθοδολογία.<sup>4</sup>

Στο γονιδίωμα του *M. tuberculosis* υπάρχουν διάσπαρτα 41 επαναλαμβανόμενες μονάδες (mycobacterial interspersed repetitive unit, MIRU). Δώδεκα από αυτές (MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 και 40) εμφανίζουν πολυμορφισμό διαφέροντας ως προς τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων και επομένως ως προς το μήκος.<sup>6</sup> Η μέθοδος γονοτυποποίησης MIRU κατηγοριοποιεί τον αριθμό των επαναλήψεων σε καθένα από τα 12 ανεξάρτητα MIRUs εφαρμόζοντας τεχνικές PCR και ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης. Δεδομένου ότι σε καθέναν από τους 12 γενετικούς τύπους υπάρχουν 2-8 αλληλίες, οι πιθανοί συνδυασμοί ανέρχονται περίπου σε 20 εκατομμύρια.<sup>4</sup> Η αξιολόγηση της μεθόδου MIRU έδειξε σχεδόν την ίδια υψηλή διακριτική ικανό-

τητα με την RFLP-IS6110, την οποία τείνει να αντικαταστήσει.<sup>4</sup> Ένα σημαντικό πλεονέκτημά της αποτελεί το γεγονός ότι το γενετικό αποτύπωμα εκφράζεται ψηφιακά, καθιστώντας δυνατή και εύκολη τη σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ εργαστηρίων. Ήδη έχει δημιουργηθεί στο διαδίκτυο παγκόσμια βάση δεδομένων για την καταχώρησή τους.<sup>7</sup>

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων (ΚΕΕΛ), η επίπτωση της φυματίωσης ήταν 6,1 περιπτώσεις κατά το 2000 και 4,8 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού κατά το 2003.<sup>8</sup> Τα στοιχεία αυτά θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως τάση ελάττωσης της επίπτωσης της νόσου, ωστόσο, και παρόλο που η φυματίωση αποτελεί υποχρεωτικά δηλούμενο νόσημα, είναι σε όλους γνωστό ότι δηλώνεται μόνο ένα ποσοστό του συνόλου των κρουσμάτων. Χαρακτηριστικό και πρόσφατο παράδειγμα αποτελούν τα αποτελέσματα της αυξημένης επιδημιολογικής επιτήρησης κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων. Ενώ στην Αττική κατά τη διάρκεια του Αυγούστου 2004 καταγράφηκαν 50 κρούσματα (Γ. Σαρόγλου, προσωπική επικοινωνία), στον ίδιο νομό κατά τη διάρκεια του έτους 2003 είχαν δηλωθεί μόνο 149 περιπτώσεις.<sup>8</sup> Επομένως, όπως έχει τονιστεί επανειλημμένα και από το ΚΕΕΛ, τα επίσημα στοιχεία υποτιμούν την πραγματική συχνότητα της σοβαρής και εξαιρετικά μεταδοτικής αυτής λοίμωξης. Μια άλλη σημαντική πλευρά του προβλήματος της φυματίωσης στην Ελλάδα αποτελεί το γεγονός ότι το ποσοστό των περιστατικών με θετική καλλιέργεια είναι εξαιρετικά χαμηλό (36,3-52,5% για τα έτη 1998-2000).<sup>8</sup> Το φαινόμενο αυτό έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μη βέβαιη διάγνωση της νόσου, αλλά και την εξαγωγή μη ορθών συμπερασμάτων αναφορικά με σημαντικές παραμέτρους, όπως είναι η συχνότητα της ανθεκτικότητας και της πολυανθεκτικότητας ή η συχνότητα της νόσου σε ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως είναι οι μετανάστες από αναπτυσσόμενες χώρες. Ίσως για όλους αυτούς τους λόγους, και παρά την παρουσία του παθογόνου αυτού στην Ελλάδα ήδη από την αρχαιότητα, οι επιδημιολογικές μελέτες της φυματίωσης στη χώρα μας είναι -στην πραγματικότητα- ελάχιστες, συνήθως δεν είναι πρόσφατες, και προέρχονται κυρίως από παιδιατρικές κλινικές ή τις ένοπλες δυνάμεις.<sup>9-11</sup>

Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της επιδημιολογίας της φυματίωσης στα δύο μεγαλύτερα πνευμονολογικά νοσοκομεία της Αττικής, το «Σωτηρία» και το «Σισμανόγλειο». Για πρώτη φορά στην Ελλάδα καταγράφηκε ένας μεγάλος αριθμός διαδοχικών περιστατικών φυματίωσης σε ενήλικες νοσηλευόμενους ασθενείς. Η καταγραφή βασίστηκε στην απομόνωση των στε-

λεχών στο εργαστήριο. Συλλέχθηκαν δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία των ασθενών, προσδιορίστηκε η ευαισθησία των αντίστοιχων στελεχών και καθορίστηκε ο γονότυπος όλων των στελεχών που απομονώθηκαν στο «Σωτηρία», καθώς και επιλεγμένων στελεχών του «Σισμανόγλειου» Νοσοκομείου, εφαρμόζοντας τη μέθοδο MIRU.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### Συλλογή των στελεχών *M. tuberculosis*

Κατά το χρονικό διάστημα 01/09/2002-01/07/2003 (10 μήνες) συλλέχθηκε το πρώτο στέλεχος *M. tuberculosis* που απομονώθηκε στο Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων του Νοσοκομείου «Σωτηρία» από τους ενήλικες ασθενείς, οι οποίοι νοσηλεύονταν στο νοσοκομείο, και κατά το χρονικό διάστημα 01/10/2002-01/08/2004 (22 μήνες) συλλέχθηκαν τα αντίστοιχα στελέχη που απομονώθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του «Σισμανόγλειου» Νοσοκομείου. Συνολικά, συλλέχθηκαν 250 στελέχη, 147 (58,8%) από το «Σωτηρία» και 103 (41,2%) από το «Σισμανόγλειο». Τα στελέχη αυτά και οι αντίστοιχοι ασθενείς αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης.

### Απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος αντοχής των στελεχών *M. tuberculosis*

Η απομόνωση των στελεχών έγινε μετά από την ενδεδειγμένη επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων και τον εμβολιασμό τους σε στερεά και υγρά θρεπτικά υλικά, Loewenstein-Jensen (bioMerieux, Γαλλία) και Mycobacterial Growth Indicator Tube, MGIT 960 (Becton Dickinson, ΗΠΑ), αντίστοιχα.<sup>12</sup> Η ταυτοποίησή τους ως είδη του συμπλέγματος *M. tuberculosis* έγινε με βάση τα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά, τις βιοχημικές ιδιότητες και την εμπορική μέθοδο ταυτοποίησης με υβριδισμό, Accuprobe *M. tuberculosis* (Gene Probe Inc, ΗΠΑ).<sup>12</sup> Τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους στην ισονιαζίδη (INH), τη στρεπτομυκίνη (SM), τη ριφαμπικίνη (RIF), την εθαμβουτόλη (EMB) και την πυραζιναμίδη (PZA) με τη μέθοδο των αναλογιών, όπως συστήνεται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (συγκεντρώσεις: INH 0,2 και 1, SM 5 και 10, RIF 20 και 40, EMB 2 και 4 μg/mL),<sup>13</sup> καθώς και με τη μέθοδο του υγρού θρεπτικού υλικού MGIT σύμφωνα με τις οδηγίες του NCCLS (συγκεντρώσεις: INH 0,1 και 0,4, SM 1 και 4, RIF 1, EMB 5 και 7,5, PZA 100 μg/mL).<sup>14</sup> Ως στέλεχος ελέγχου ποιότητας χρησιμοποιήθηκε το *M. tuberculosis* H37Rv. Όλα τα στελέχη φυλάχθηκαν στους -70 °C, μέχρι να διενεργηθεί η γονοτυπική ανάλυση.

### Καταγραφή των δημογραφικών, κλινικών και εργαστηριακών στοιχείων των ασθενών

Για την καταγραφή των δημογραφικών, κλινικών και εργαστηριακών στοιχείων των ασθενών αναπτύχθηκε ερωτηματο-

λόγιο, το οποίο συμπληρώθηκε για όλους τους ασθενείς μετά από προσωπική συνέντευξη με αυτούς, μετά από επικοινωνία με το θεράποντα ιατρό και από τα στοιχεία των ιατρικών φακέλων και των αρχείων των εργαστηρίων. Καταγράφηκαν οι παρακάτω παράμετροι: ηλικία, φύλο, επάγγελμα, τόπος διαμονής, τόπος γέννησης, χρονολογία εισόδου στην Ελλάδα και χώρα προέλευσης για τους αλλοδαπούς, εντόπιση της νόσου (πνευμονική, εξωπνευμονική ή γενικευμένη), αποτέλεσμα της εξέτασης Μαντουχ, αποτέλεσμα της οξεάντοχης χρώσης του κλινικού δείγματος, αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας, παρουσία ανοσοκαταστολής (ύπαρξη συγγενούς ή επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, μεταμόσχευση, χρήση κυτταροστατικών, λήψη κορτικοστεροειδών >2 μήνες, υποσιτισμός), ύπαρξη άλλης χρόνιας νόσου, χρήση ναρκωτικών ουσιών (ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών κατά τους τελευταίους 12 μήνες), κατάχρηση αλκοόλ (σύμφωνα με τα κριτήρια του Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV), ιδρυματοποίηση (σε φυλακή, ψυχιατρική κλινική, κατάλυμα για λαθρομετανάστες ή άλλου είδους ίδρυμα), ιστορικό προηγούμενης (οικογενειακής, κοινωνικής ή επαγγελματικής) έκθεσης στη φυματίωση, τεκμηριωμένη διάγνωση φυματίωσης στο παρελθόν, ημερομηνία διάγνωσης φυματίωσης στο παρελθόν, ολοκλήρωση της ενδεικνυόμενης αντιφυματικής αγωγής στο παρελθόν και ύπαρξη χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου (με βάση το επάγγελμα, όπως άστεγοι, άποροι, άνεργοι, λαθρομετανάστες, περιστασιακά εργαζόμενοι, ισχνά αμειβόμενοι, ανειδίκευτοι εργάτες). Η καταγραφή και η ανάλυση όλων των δεδομένων έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρηθεί η ανωνυμία των ασθενών.

### Γονοτυποποίηση των στελεχών *M. tuberculosis*

Η μέθοδος γονοτυποποίησης MIRU εφαρμόστηκε σε όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν στο Νοσοκομείο «Σωτηρία» και σε επιλεγμένα στελέχη του «Σισμανόγλειου» Νοσοκομείου (στελέχη που απομονώθηκαν από ιδρυματοποιημένους ασθενείς). Τα στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν σε υλικό Loewenstein-Jensen και συλλέχθηκε αρκετή ποσότητα αποικιών, η οποία επαναιωρήθηκε σε 500 μL TE και απενεργοποιήθηκε στους 80 °C για 30 min. Μετά από διαδοχική επώαση με λυσοζύμη (20 mg/mL), 10% SDS και πρωτεΐναση-K (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Ελλάδα), ακολούθησε η εκκύλιση και η απομόνωση του DNA με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφόρμιου. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν 12 μέθοδοι PCR, οι οποίες πολλαπλασιάζουν τις 12 πολυμορφικές περιοχές MIRU (2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39 και 40) του γονιδιώματος του *M. tuberculosis*.<sup>6</sup> Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν 50 μL (5 μL απομονωμένου DNA και 45 μL Mastermix) και η τελική συγκέντρωση των αντιδραστικών ήταν 3 mM MgCl<sub>2</sub> (MIRU 4, 26, 40), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (MIRU 10, 16, 31), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (MIRU 2, 23, 39) και 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (MIRU 20, 24, 27), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 μM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Promega, ΗΠΑ), 200 nM κάθε εκκινητή (Thermoelectron, Γερμανία) και 0,05 U/μL πολυμεράσης (HotStartTaq DNA polymerase kit, Qiagen, Γερμανία). Οι αλληλουχίες των 24 εκκινητών έχουν αναφερθεί προηγουμένως.<sup>6</sup> Χρησιμοποιήθηκε

ο θερμοκυκλοποιητής MJ (Waltham, ΗΠΑ) με ίδιες συνθήκες αντίδρασης για όλες τις PCR [αρχικό στάδιο αποδιάταξης (95 °C, 15 min), 40 κύκλοι αποδιάταξης (94 °C, 1 min), υβριδισμού (59 °C, 1 min) και επέκτασης (72 °C, 90 sec) και τελικό στάδιο επέκτασης (72 °C, 10 min)]. Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε σε 3% αγαρόζη (Nusieve 3:1, ΒΜΑ, ΗΠΑ) για 5 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5×TBE με βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μg/mL, παρουσία δείκτη 1500 bp ή 3000 bp με διαχωριστική ικανότητα ανά 100 bp (Promega, ΗΠΑ) και απεικονίστηκε υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών για κάθε MIRU προσδιορίστηκε από το μήκος του προϊόντος της PCR. Ως πρότυπο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε το H37Rv. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε ανεξάρτητα από δύο άτομα.

### Προσδιορισμός της γενετικής ποικιλομορφίας

Η γενετική ποικιλομορφία ( $h$ ) του κάθε MIRU προσδιορίστηκε με βάση τον τύπο:

$$h = 1 - \sum x_i^2 \left[ \frac{n}{(n-1)} \right]$$

όπου  $x_i$  είναι η συχνότητα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας στο κάθε MIRU και  $n$  είναι ο συνολικός αριθμός των στελεχών.<sup>15</sup>

### Προσδιορισμός του δείκτη Hunter-Gaston

Ο δείκτης Hunter-Gaston (HGI) προσδιορίζει τη διακριτική ικανότητα μιας μεθόδου με βάση τον τύπο:

$$D = 1 - \left[ \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j (n_j - 1) \right]$$

όπου  $D$  είναι ο δείκτης διακριτικής ικανότητας,  $n_j$  είναι ο αριθμός των στελεχών που ανήκουν στον  $j$ th γονότυπο,  $s$  ο συνολικός αριθμός των στελεχών που είναι γονοτυπικά ανόμοια και  $N$  ο συνολικός αριθμός των στελεχών.<sup>16</sup>

### Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων εφαρμόστηκαν τα Students'  $t$  test,  $\chi^2$  και Fisher exact test, όπως ενδείκνυται.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία των 250 διαδοχικών ασθενών με φυματίωση. Οι περισσότεροι ήταν Έλληνες (68,8%), άνδρες (75,6%) και διέμεναν στην Αττική (76%). Η μέση ηλικία αντιστοιχούσε σε  $49,7 \pm 19,4$  έτη και σχεδόν οι μισοί (46,8%) εμφάνιζαν χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο. Η πλειοψηφία είχε θετική Mantoux (86,1%) και θετική την άμεση αντίδραση οξείνουχου

βακτηριδίου (73,2%). Το 90,8% των ασθενών έπασχε από πνευμονική φυματίωση, ενώ το 5,2% παρουσίαζε γενικευμένη νόσο. Βρέθηκε ότι 9,6% ήταν ανοσοκατασταλμένοι, αλλά σχεδόν το ένα τρίτο έπασχε από άλλο χρόνιο νόσημα (27,6%). Ιδρυματοποίηση αναφέρθηκε στο 7,6%, κατάχρηση αλκοόλ ή και χρήση ενδοφλέβιων ουσιών στο 11,2% και προηγούμενη έκθεση στη νόσο στο 11,2% των ασθενών.

Τεκμηριωμένη νόσηση από φυματίωση στο παρελθόν αναφέρθηκε από 28 ασθενείς (11,2%), 16 Έλληνες και 12 αλλοδαπούς. Από αυτούς, οι μισοί (7 Έλληνες και 7 αλλοδαποί) δεν είχαν ολοκληρώσει την ενδεικνυόμενη θεραπεία και ανέφεραν διακοπή θεραπείας μετά από 2–3 μήνες ή μη συστηματική λήψη της αγωγής ή έλλειψη φαρμάκων στη χώρα διαμονής. Από τους 28 ασθενείς, το 40,7% είχε διαγνωστεί πριν από <5 χρόνια και το 29,8% πριν από >10 χρόνια.

Τα ποσοστά διάγνωσης της φυματίωσης σε αλλοδαπούς ασθενείς ήταν παρόμοια στα δύο νοσοκομεία (49 ασθενείς στο «Σωτηρία», 33,3%, και 29 ασθενείς στο «Σισμανόγλειο», 28,2%). Η ανάλυση των δημογραφικών στοιχείων των ασθενών αυτών (συνολικά 78 άτομα) έδειξε ότι προέρχονταν από 22 χώρες, ωστόσο οι μισοί από αυτούς (40 ασθενείς, 51,3%) προέρχονταν από χώρες της Ανατολικής Ευρώπης. Ο μέσος χρόνος παραμονής τους στην Ελλάδα ήταν  $60,6 \pm 65,7$  μήνες (για το 60,4% <5 χρόνια και για το 19% >10 χρόνια).

Η σύγκριση των δεδομένων μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Υψηλότερο ποσοστό αλλοδαπών ασθενών διέμεναν στην Αττική σε σύγκριση με τους Έλληνες (89,7% και 69,8%, αντίστοιχα,  $P=0,001$ ), παρουσίαζε χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο (66,7% και 37,8%, αντίστοιχα,  $P<0,001$ ), θετική αντίδραση Mantoux (93,7% και 81,8%, αντίστοιχα,  $P=0,030$ ) και ήταν φυλακισμένοι (5,1% και 0,6%, αντίστοιχα,  $P=0,034$ ). Αντίθετα, οι Έλληνες εμφάνιζαν συχνότερα άλλη χρόνια νόσο (36% και 9%, αντίστοιχα,  $P<0,001$ ), ανοσοκαταστολή (11,1% και 6,4%, αντίστοιχα,  $P=0,025$ ) και μεγαλύτερη μέση ηλικία ( $56,8 \pm 18,3$  και  $34,0 \pm 10,3$  έτη, αντίστοιχα,  $P<0,001$ ). Η ανάλυση της κατανομής της ηλικίας στους δύο πληθυσμούς έδειξε ότι στο 74,4% των αλλοδαπών η ηλικία κυμαινόταν από 25–44 έτη. Αντίθετα, στους Έλληνες ασθενείς παρατηρήθηκε δικόρυστη κατανομή της ηλικίας: 40,1% των ασθενών παρουσίαζαν ηλικία 35–54 ετών και 36% ηλικία >65 ετών.

Αντοχή στην INH ανιχνεύτηκε σε 36 στελέχη (14,4%), στη RIF σε 13 (5,2%), στην EMB σε 16 (6,4%), στην

**Πίνακας 1.** Χαρακτηριστικά 250 Ελλήνων και αλλοδαπών ασθενών με φυματίωση.

	Σύνολο ασθενών n=250	Έλληνες n=172	Αλλοδαποί n=78	P
Άρρεν φύλο	189 (75,6%)	131 (76,2%)	58 (74,4%)	0,758
Μέση ηλικία (εύρος)	49,7±19,4 έτη (18-99)	56,8±18,3 έτη (18-99)	34,0±10,3 έτη (18-74)	<0,001
Διαμονή στην Αττική	190 (76%)	120 (69,8%)	70 (89,7%)	0,001
Χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο	117 (46,8%)	65 (37,8%)	52 (66,7%)	<0,001
Μέσος χρόνος παραμονής στην Ελλάδα (εύρος)			n=58 60,6±65,7 μήνες (1-324)	
Εντόπιση νόσου				
Πνευμονική	227 (90,8%)	156 (90,7%)	71 (91%)	0,684
Εξωπνευμονική	10 (4,0%)	6 (3,5%)	4 (5,1%)	
Γενικευμένη	13 (5,2%)	10 (5,8%)	3 (3,9%)	
Οξεία χρώση (+)	183 (73,2%)	122 (70,9%)	61 (78,2%)	0,229
Mantoux (+) <sup>β</sup>	149/173 (86,1%)	90/110 (81,8%)	59/63 (93,7%)	0,030
Ανοσοκαταστολή <sup>γ</sup>	24 (9,6%)	19 (11,1%)	5 (6,4%)	0,025
Άλλη χρόνια νόσος <sup>δ</sup>	69 (27,6%)	62 (36,0%)	7 (9,0%)	<0,001
Έκθεση στο κοινωνικό περιβάλλον <sup>ε</sup>	19 (7,6%)	11 (6,4%)	8 (10,3%)	0,286
Επαγγελματική έκθεση <sup>στ</sup>	6 (2,4%)	5 (2,9%)	1 (1,3%)	0,668
Ιστορικό φυματίωσης	28 (11,2%)	16 (9,3%)	12 (15,4%)	0,158
Ανεπαρκής θεραπεία	14 (5,6%)	7 (4,1%)	7 (9,0%)	0,140
Κατάχρηση ουσιών	28 (11,2%)	21 (12,2%)	7 (9,0%)	0,452
Αλκοόλ	18 (7,2%)	15 (8,7%)	3 (3,8%)	0,167
Ευδοφλέβια ναρκωτικά	10 (4,0%)	6 (3,5%)	4 (5,1%)	0,508
Διαμονή σε Ιδρύματα	19 (7,6%)	13 (7,6%)	6 (7,7%)	0,970
Ψυχιατρικές κλινικές	12 (4,8%)	12 (7,0%)	0 (0%)	
Φυλακή	5 (2%)	1 (0,6%)	4 (5,1%)	0,034
Κατάλυμα για λαθρομετανάστες	2 (0,8%)	0 (0%)	2 (2,6%)	

<sup>α</sup> Αριθμός διαφορετικών περιοχών διαμονής (εκτός Αττικής): n=22

<sup>β</sup> Η εξέταση Mantoux δεν έγινε ή ήταν άγνωστο το αποτέλεσμα της σε 77 ασθενείς (62 Έλληνες, 15 αλλοδαποί)

<sup>γ</sup> Η ανοσοκαταστολή περιελάμβανε: κακοήθειες (n=13, ο ένας ασθενής αλλοδαπός), AIDS (n=4, οι 2 ασθενείς αλλοδαποί), αυτοάνοσο νόσημα (n=2), μακροχρόνια λήψη κορτικοειδών (n=3), υποσιτισμό (n=2 αλλοδαποί ασθενείς)

<sup>δ</sup> Άλλα χρόνια νοσήματα: σακχαρώδης διαβήτης (n=26), καρδιαγγειακά νοσήματα (n=22), ψυχικές διαταραχές (n=17), ηπατίτιδα C (n=12), χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (n=9) και άλλα (n=5)

<sup>ε</sup> Όλοι ανέφεραν έκθεση στο οικογενειακό περιβάλλον, εκτός από 2 άτομα (έκθεση σε φιλικό περιβάλλον)

<sup>στ</sup> Περιλαμβάνονταν 3 ιατροί και 3 νοσηλεύτριες

PZA σε 7 (2,8%) και στη SM σε 59 (23,6%). Τα ποσοστά αντοχής σε ένα, δύο, τρία, τέσσερα και πέντε αντιφυματικά ήταν 17,6% (44 στελέχνη), 7,2% (18 στελέχνη), 2% (5 στελέχνη), 1,6% (4 στελέχνη) και 1,6% (4 στελέχνη), αντίστοιχα, ενώ αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιφυματικό φάρμακο εμφάνισαν 75 στελέχνη (30%). Καμιά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών ασθενών ως προς τις παραπάνω συχνότητες. Τέλος, ανιχνεύθηκαν 12 πολυανθεκτικά στελέχνη (4,8%), 6 σε Έλληνες (3,5%) και 6 σε αλλοδαπούς ασθενείς (7,7%, P=0,199). Όλα τα πολυανθεκτικά στελέχνη που προέρχονταν από αλλοδαπούς, απομονώθηκαν από ασθενείς που κατάγονταν από χώρες της Ανα-

τολικής Ευρώπης (6 στους 40 ασθενείς, συχνότητα 15%, σύγκριση με συχνότητα ανίχνευσης πολυανθεκτικών στελεχών σε Έλληνες ασθενείς, P=0,012).

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ πολυανθεκτικότητας και ιστορικού φυματίωσης στο παρελθόν. Μεταξύ 28 ασθενών με ιστορικό προηγούμενης φυματίωσης υπήρχαν 9 ασθενείς με πολυανθεκτική φυματίωση (32,1%), έναντι 3 ασθενών με πολυανθεκτική φυματίωση μεταξύ 222 ασθενών χωρίς προηγούμενο ιστορικό της νόσου (1,4%, P<0,001). Η ανάλυση των στοιχείων των 12 ασθενών με πολυανθεκτική φυματίωση έδειξε ότι 9 από αυτούς ήταν άνδρες, η μέση ηλικία τους ήταν 44,5 έτη (εύρος 22-74

έτη), 8 κατοικούσαν στην Αττική, 7 παρουσίαζαν χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, ένας ανέφερε επαγγελματική έκθεση (ιατρός), όλοι παρουσίαζαν πνευμονική εντόπιση της νόσου και θετική οξεάντοχη χρώση, κανένας δεν ήταν ανοσοκατασταλμένος, 9 ανέφεραν νόσηση από φυματίωση στο παρελθόν (οι 6 δεν είχαν λάβει επαρκή θεραπεία) και ένας ήταν ιδρυματοποιημένος (φυλακισμένος).

Η μέθοδος MIRU εφαρμόστηκε στα 147 διαδοχικά στελέχη *M. tuberculosis*, τα οποία απομονώθηκαν στο «Σωτηρία» από 98 Έλληνες και 49 αλλοδαπούς ασθενείς. Η μέθοδος προσδιόρισε το γονότυπο σε όλα τα στελέχη (100% τυποποιητική ικανότητα). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν 100% σε 20 τυχαία επιλεγμένα στελέχη, στα οποία επαναλήφθηκε η εξέταση.

Η εξέταση των 147 στελεχών έδειξε ότι υπήρχαν 145 γονότυποι, από τους οποίους οι 143 ήταν μοναδικοί (αντιπροσωπεύονταν από ένα μόνο στέλεχος), ενώ οι υπόλοιποι δύο αποτελούσαν ομάδες, οι οποίες περιλάμβαναν δύο στελέχη η καθεμιά. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε τα στελέχη 69 και 70 (τύπος MIRU 2, 2, 3, 1, 2, 6, 1, 4, 3, 3, 2, 1). Οι δύο ασθενείς ήταν Έλληνες άνδρες, ηλικίας 44 και 74 ετών, αντίστοιχα, κατοικούσαν στην Πόλη Α (πληθυσμός 280.000 κατοίκων) και παρουσίαζαν συγγένεια πρώτου βαθμού. Τα αντίστοιχα κλινικά δείγματα είχαν παραληφθεί την ίδια μέρα στο εργαστήριο, το ένα στέλεχος ήταν ανθεκτικό και στα πέντε αντιφυματικά και το άλλο ήταν ευαίσθητο μόνο στην EMB. Η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε τα στελέχη 85 και 138 (τύπος MIRU 2, 2, 4, 1, 2, 5, 1, 4, 3, 3, 2, 3). Οι ασθενείς αυτοί ήταν Έλληνες άνδρες, ηλικίας 40 και 45 ετών, αντίστοιχα, με το ίδιο επάγγελμα (οικοδόμοι) και κατοικούσαν στην Πόλη Β (πληθυσμός 12.000 κατοίκων). Τα δύο στελέχη ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιφυματικά, ενώ ο χρόνος που μεσολάβησε για την παραλαβή των αντίστοιχων κλινικών δειγμάτων στο εργαστήριο ήταν 5 μήνες.

Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου, σύμφωνα με το δείκτη HGI, ήταν ίση με 0,9998. Η γενετική ποικιλομορφία ( $h$ ) των 12 MIRU παρουσιάζεται στον πίνακα 2. Τα MIRU 2, 24 και 27 εμφάνιζαν χαμηλή ( $h < 0,3$ ), τα MIRU 4, 16, 20 και 39 μεσαία ( $0,3 \leq h < 0,6$ ), ενώ τα MIRU 10, 23, 26, 31 και 40 υψηλή διακριτική ικανότητα ( $0,6 \leq h$ ). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν συγκρίνοντας τη γενετική ποικιλομορφία των στελεχών που απομονώθηκαν από αλλοδαπούς ή Έλληνες ασθενείς, καθώς και των στελεχών που ήταν ευαίσθητα ή παρουσίαζαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιφυματικό φάρμακο.

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης παρατηρήθηκε ότι 5 ιδρυματοποιημένοι ασθενείς της μελέτης νοσηλεύονταν στην ίδια ψυχιατρική κλινική (Κλινική Α). Τα αντίστοιχα στελέχη παρουσίαζαν τον ίδιο τύπο αντοχής, αντοχή σε INH και SM, φαινότυπος που ανιχνεύτηκε σε 15 συνολικά στελέχη της εργασίας (6%). Τα ευρήματα αυτά έθεσαν το ερώτημα της μετάδοσης της φυματίωσης μέσα στην Κλινική Α και αποφασίστηκε να γονοτυποποιηθούν όλα τα στελέχη της μελέτης, τα οποία προέρχονταν από ιδρυματοποιημένους ασθενείς. Από τα 19 στελέχη (9 από το «Σωτηρία» και 10 από το «Σισμανόγλειο»), 2 δεν μπόρεσαν να ανακαλλιεργηθούν (προέλευση αντίστοιχων ασθενών: κατάλυμα για λαθρομετανάστες). Η ανάλυση των υπολοίπων 17 στελεχών (προέλευση αντίστοιχων ασθενών: 12 από ψυχιατρικές κλινικές και 5 από φυλακές) έδειξε ότι 7 παρουσίαζαν τον ίδιο γονότυπο (MIRU 2, 3, 2, 1, 2, 5, 1, 2, 3, 3, 2, 3), ενώ τα υπόλοιπα εμφάνιζαν μοναδικούς γονότυπους (πίν. 3). Επομένως, σε 12 συνολικά στελέχη ασθενών ιδρυματοποιημένων σε ψυχιατρικές κλινικές, τα 7 αποτελούσαν ομάδα (58,3%). Τα 5 προέρχονταν από τους ασθενείς της Κλινικής Α, ενώ τα άλλα 2 από ασθενείς δύο άλλων ψυχιατρικών κλινικών (Κλινικές Β και Γ). Όλα παρουσίαζαν τον ίδιο φαινότυπο αντοχής (αντοχή σε INH και SM), εκτός από ένα, που ήταν επιπλέον ανθεκτικό στην EMB. Όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν πνευμονική φυματίωση και θετική οξεάντοχη χρώση των πτυέλων. Τα αντίστοιχα κλινικά δείγματα είχαν παραληφθεί στο εργαστήριο μέσα σε χρονικό διάστημα 13 μηνών. Οι Κλινικές Α, Β και Γ βρίσκονται στην Αθήνα.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρώτη αυτή μελέτη της επιδημιολογίας της φυματίωσης σε ενήλικες ασθενείς των δύο μεγαλύτερων πνευμονολογικών νοσοκομείων της Αττικής προσδιορίζει καταρχήν τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά τους. Δεδομένης της επιλογής των νοσοκομείων, οι περισσότεροι ασθενείς διέμεναν στην Αττική (76%) και παρουσίαζαν πνευμονική εντόπιση της φυματίωσης (90,8%). Όπως περιγράφεται για την πνευμονική φυματίωση, οι περισσότεροι ήταν άνδρες (75,6%).<sup>17</sup> Το υψηλό ποσοστό θετικής οξεάντοχης χρώσης (73,2%) σχετίζεται πιθανότατα με την υψηλή συχνότητα πνευμονικής νόσου. Η Mantoux ήταν θετική σε 86,1% των ασθενών, σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα.<sup>2</sup> Αναγνωρίστηκαν γνωστοί παράγοντες κινδύνου της φυματίωσης και προσδιορίστηκε η συχνότητά τους. Τέλος, σε ποσοστό 46,8%, οι ασθενείς παρουσίαζαν χαμη-

**Πίνακας 2.** Ανίχνευση γενετικής ποικιλομορφίας (h) των 12 MIRU σε 250 στελέχη *M. tuberculosis*.

	Αριθμός επαναλήψεων στο γενετικό τόπο											h			
	0	1	2	2'	3	3'	4	5	6	7	8		9	10	11
MIRU 2		10	136		2										0,15
MIRU 4		2	104	3	18	21									0,47
MIRU 10		1	15		38		27	37	14	11	1	3		1	0,81
MIRU 16	23	108	10		7										0,43
MIRU 20		34	109		5										0,40
MIRU 23		7	8		29		11	70	18	5					0,70
MIRU 24		148													0,00
MIRU 26		8	10		10		25	72	13	5	3	2			0,70
MIRU 27					147		1								0,01
MIRU 31		12	25		79		12	13	7						0,64
MIRU 39		2	116		30										0,34
MIRU 40		12	28		61		33	5	7	1		1			0,72

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα γονοτυποποίησης με τη μέθοδο MIRU σε 17 στελέχη *M. tuberculosis* που απομονώθηκαν από τους ιδρυματοποιημένους ασθενείς της μελέτης.

Αριθμός στελέχους	MIRU 2	MIRU 4	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
5	2	2	3	1	2	6	1	5	3	3	2	4
10	2	3	3	1	2	5	1	5	3	3	2	1
15	2	3	2	0	1	5	1	2	3	3	1	3
19	2	3	3	0	1	5	1	2	3	3	2	3
37	2	2	2	1	2	5	1	5	3	5	3	3
86	2	2	9	3	1	7	1	5	3	1	2	3
107	2	2	3	0	2	6	1	4	3	4	2	7
130	2	3	3	1	2	5	1	2	3	3	2	7
132	2	2	6	1	2	5	1	3	3	5	2	3
120*	2	3	2	1	2	5	1	2	3	3	2	3
154*	2	3	2	1	2	5	1	2	3	3	2	3
156	2	2	2	1	2	5	1	2	3	4	2	4
186*	2	3	2	1	2	5	1	2	3	3	2	3
191*	2	3	2	1	2	5	1	2	3	3	2	3
194*	2	3	2	1	2	5	1	2	3	3	2	3
198*	2	3	2	1	2	5	1	2	3	3	2	3
214*	2	3	2	1	2	5	1	2	3	3	2	3

\* Στελέχη τα οποία εμφανίζουν τον ίδιο γονότυπο

λό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, όπως κλασικά αναφέρεται για τη «νόσο των φτωχών».<sup>2</sup>

Η παρουσία μεταναστών που προέρχονται από αναπτυσσόμενες χώρες έχει συνδεθεί τόσο με την αύξηση της επίπτωσης της φυματίωσης, όσο και με την πολυανθεκτική φυματίωση.<sup>2,3</sup> Στην παρούσα μελέτη, οι αλλοδα-

ποί ασθενείς αποτελούσαν περίπου το ένα τρίτο των ασθενών (31,2%). Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα στοιχεία που δηλώνονται στο ΚΕΕΛ, σύμφωνα με τα οποία, από το 1998–2002 οι αλλοδαποί αποτελούσαν μόνο το 12,6% όλων των περιστατικών φυματίωσης στη χώρα.<sup>8</sup> Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, στις δυτικοευρωπαϊκές χώρες, το ποσοστό συμμετοχής των

μεταναστών στο συνολικό αριθμό των ασθενών με φυματίωση κυμαίνεται από 42–56%.<sup>18-23</sup>

Η υψηλή συχνότητα διάγνωσης της φυματίωσης σε αλλοδαπούς στον πληθυσμό των ασθενών μας οδήγησε στη σύγκριση των χαρακτηριστικών μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών. Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα αφορούσε στην κατανομή της ηλικίας των Ελλήνων ασθενών. Ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες, στις οποίες η μετάδοση της φυματίωσης είναι ασυνήθιστη, ποσοστό >80–90% των κρουσμάτων της φυματίωσης εμφανίζεται σε ασθενείς της τρίτης ηλικίας και αποδίδεται σε ενεργοποίηση παλαιάς λοίμωξης λόγω της ανοσοκαταστολής της μεγάλης ηλικίας, στις αναπτυσσόμενες χώρες παρατηρείται η χαρακτηριστική δικόρυφη κατανομή που καταγράφηκε στους Έλληνες ασθενείς.<sup>1</sup> Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν συνεχιζόμενη μετάδοση της φυματίωσης στον πληθυσμό που εξετάστηκε και συμφωνούν με τα στοιχεία του ΚΕΕΛ.<sup>8</sup> Το γεγονός ότι το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στους αλλοδαπούς, θα πρέπει να αποδοθεί στον πολύ μικρό αριθμό μεταναστών μεγάλης ηλικίας.

Η συχνότερη παρουσία άλλης χρονίας νόσου ( $P<0,001$ ) και ανοσοκαταστολής ( $P=0,025$ ) στους Έλληνες σε σύγκριση με τους αλλοδαπούς πιθανόν σχετίζεται με τη διαφορά της ηλικίας των δύο πληθυσμών ( $56,8\pm 18,3$  και  $34,0\pm 10,3$  έτη, αντίστοιχα,  $P<0,001$ ). Αναφορικά με την ανοσοκαταστολή, σε αντίθεση με άλλες χώρες στις οποίες το AIDS αποτελεί έναν από τους συχνότερους παράγοντες κινδύνου νόσησης από φυματίωση,<sup>2</sup> μόνο 4 άτομα βρέθηκε ότι έπασχαν από AIDS (1,6%). Προφανώς, η χαμηλή επίπτωση του συνδρόμου στην Ελλάδα διαφοροποιεί τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της φυματίωσης στη χώρα μας.

Στους αλλοδαπούς ασθενείς ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερη συχνότητα η διαμονή στην Αττική ( $P=0,001$ ), το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο ( $P<0,001$ ), ο εγκλεισμός στη φυλακή ( $P=0,034$ ) και η θετική αντίδραση Mantoux ( $P=0,030$ ). Τα ευρήματα αυτά αντανακλούν πιθανότατα δημογραφικές και κοινωνικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών των ασθενών, η συχνότερη όμως ανίχνευση θετικής Mantoux σε αλλοδαπούς ασθενείς ίσως σχετίζεται, για άγνωστους λόγους, με τη λιγότερο συχνή εφαρμογή της εξέτασης σε Έλληνες ασθενείς της μελέτης (ποσοστά εφαρμογής εξέτασης σε Έλληνες και αλλοδαπούς ασθενείς 64% και 81%, αντίστοιχα,  $P=0,002$ ).

Από το 1998 μέχρι και το 2002 προσδιορίστηκε στο Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων του Νοσοκομείου «Σωτηρία» η ευαισθησία στα αντιφυματικά φάρμακα 2753 στελεχών *M. tuberculosis*. Η συνολική αντοχή στην ισο-

νιαζίδη ήταν 7,9%, στη ριφαμπικίνη 3,8% και στη στρεπτομυκίνη 7,5%. Η πολυανθεκτικότητα από το 2000 μέχρι το 2002 ήταν 2,46%, 2,38% και 3,85%, αντίστοιχα.<sup>8</sup> Ανακοινώσεις από το ίδιο Εργαστήριο καταγράφουν αυξητική τάση της ανθεκτικότητας την τελευταία δεκαετία και υψηλότερα ποσοστά αντοχής σε στελέχη αλλοδαπών ασθενών.<sup>24</sup>

Στη μελέτη αυτή, η οποία περιλαμβάνει συγκριτικά πολύ μικρότερο αριθμό στελεχών αλλά εξετάζει διαδοχικούς ασθενείς συγκεκριμένης γεωγραφικής περιοχής, ανιχνεύτηκαν υψηλότερα ποσοστά αντοχής στη στρεπτομυκίνη (23,6%) και την ισονιαζίδη (14,4%). Το ποσοστό πολυανθεκτικής φυματίωσης ήταν 4,8%, ωστόσο η σύγκριση μεταξύ Ελλήνων και αλλοδαπών ασθενών που προέρχονταν από χώρες της Ανατολικής Ευρώπης έδειξε τετραπλάσια συχνότητα της πολυανθεκτικότητας στους τελευταίους (3,5% και 15%, αντίστοιχα,  $P=0,012$ ). Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί,<sup>25</sup> η πολυανθεκτικότητα σχετίστηκε με προηγούμενο ιστορικό φυματίωσης ( $P<0,001$ ). Επομένως, προσδιορίστηκαν δύο τουλάχιστον αναγνωρίσιμα χαρακτηριστικά της πολυανθεκτικής φυματίωσης στην περιοχή μας, το προηγούμενο ιστορικό φυματίωσης και η προέλευση του ασθενούς από χώρες της Ανατολικής Ευρώπης. Με την εξαίρεση της υψηλής αντοχής στη στρεπτομυκίνη, που πιθανότατα αντανακλά την εκτεταμένη χρήση του φαρμάκου στο παρελθόν, όλα τα παραπάνω είναι συμβατά με τάση ανόδου της ανθεκτικότητας της φυματίωσης, τουλάχιστον στη γεωγραφική περιοχή που εξετάστηκε.

Η γονοτυπική μέθοδος MIRU έδειξε άριστα αποτελέσματα επαναληψιμότητας και τυποποιητικής ικανότητας, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως,<sup>4</sup> και η διακριτική της ικανότητα ήταν υψηλή (0,998). Η αξιολόγηση της γενετικής ποικιλομορφίας των 12 MIRU έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με άλλες μελέτες. Οι Sola et al ανέφεραν την ίδια γενετική ποικιλομορφία σε 116 στελέχη *M. tuberculosis*, τα οποία προέρχονταν από 11 γεωγραφικές περιοχές, με τη διαφορά ότι, σε αντίθεση με τα ευρήματά μας, το MIRU 24 παρουσίαζε μεσαία και το MIRU 20 χαμηλή διακριτική ικανότητα.<sup>26</sup> Παρόμοια ταξινόμηση, με μόνη διαφορά τη χαμηλή διακριτική ικανότητα του MIRU 23, αναφέρθηκε από τους Cowan et al εξετάζοντας στελέχη από τις ΗΠΑ.<sup>27</sup>

Στα 147 στελέχη που απομονώθηκαν από το «Σωτηρία», το ποσοστό ομαδοποίησης ήταν 1,4% (2 γονοτυπικές ομάδες σε σύνολο 145 διακριτών γονοτύπων) και 4 μόνο ασθενείς (2,7%) είχαν μολυνθεί από στελέχη που ανήκαν σε ομάδες. Η μεγάλη αυτή γενετική ποικιλομορφία θα μπορούσε να ήταν το αποτέλεσμα εξαιρετικά χαμηλής μετάδοσης της φυματίωσης στον πληθυσμό.



σμό που εξετάστηκε, εάν δεν ερχόταν σε αντίθεση με τα ευρήματα της κατανομής της ηλικίας στους Έλληνες ασθενείς. Επιπλέον, παρά τον ικανό αριθμό στελεχών της μελέτης, το χρονικό διάστημα της συλλογής των στελεχών στο Νοσοκομείο «Σωτηρία» ήταν μικρό (10 μήνες). Είναι γνωστό ότι για την αντιπροσωπευτικότητα των αποτελεσμάτων των επιδημιολογικών ερευνών είναι απαραίτητη η συλλογή μεγάλου αριθμού στελεχών σε μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε μελέτες άλλων χωρών, το ποσοστό ομαδοποίησης έχει βρεθεί πολύ υψηλότερο (εύρος 13,7–46%), ωστόσο στις εργασίες αυτές εξετάζονταν όλα τα διαδοχικά στελέχη *M. tuberculosis* που απομονώθηκαν στην αντίστοιχη χώρα κατά τη διάρκεια αρκετών ετών.<sup>18–23</sup>

Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η ορθότητα των αποτελεσμάτων της γονοτυποποίησης επιβεβαιώνεται από την επιδημιολογική σχέση που αναγνωρίστηκε μεταξύ των ασθενών με γονοτυπικά ταυτόσημα στελέχη, καθώς και από τα συμβατά αποτελέσματα του ελέγχου ανοχής. Η εργαστηριακή επιμόλυνση μεταξύ κλινικών δειγμάτων δεν μπορεί να θεωρηθεί πιθανή λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που μεσολάβησε. Οι δύο ασθενείς της Πόλης Α ήταν συγγενείς και μάλιστα ανέφεραν ότι ένας τρίτος συγγενής τους είχε μεταδώσει την πολυανθεκτική φυματίωση από το 1993, ενώ οι δύο ασθενείς της Πόλης Β προέρχονταν από την ίδια μικρή πόλη και ανέφεραν το ίδιο επάγγελμα. Η ταυτοποίηση του ίδιου

γονότυπου σε πέντε στελέχη από ισάριθμους ασθενείς της Κλινικής Α μέσα σε χρονικό διάστημα 13 μηνών αποτελεί απόδειξη επιδημικής έξαρσης της φυματίωσης στο νοσηλευτικό αυτό ίδρυμα. Επειδή οι ψυχιατρικοί ασθενείς ενδέχεται να νοσηλεύονται διαδοχικά σε διάφορες κλινικές, η ανεύρεση του ίδιου γονότυπου σε στελέχη δύο ασθενών των Κλινικών Β και Γ συνεπάγεται «κυκλοφορία» του κλώνου αυτού σε τρεις τουλάχιστον ψυχιατρικές κλινικές της Αθήνας. Επομένως, η ανίχνευση του ίδιου κλώνου σε 7 από τους 12 (58,3%) ασθενείς της μελέτης, οι οποίοι νοσηλεύονταν σε ψυχιατρικές κλινικές της Αθήνας, υποδηλώνει πρόσφατη μετάδοση της φυματίωσης σε έναν επιδημιολογικά σχετιζόμενο υποπληθυσμό ασθενών υψηλού κινδύνου. Η αναγνώριση της μετάδοσης της φυματίωσης αναφέρεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα και είναι σαφές ότι έγινε εφικτή χάρη στην εφαρμογή της γονοτυποποιητικής μεθόδου σε συνδυασμό με λεπτομερή συλλογή επιδημιολογικών στοιχείων από ένα μεγάλο αριθμό ασθενών.

Συμπερασματικά, στην εργασία αυτή περιγράφεται η επιδημιολογία της πνευμονικής φυματίωσης στην Αττική και τεκμηριώνεται το πρώτο επεισόδιο επιδημικής έξαρσης. Η συλλογή στοιχείων των ασθενών και η μελέτη των αντίστοιχων στελεχών συνεχίζεται, με σκοπό το λεπτομερή προσδιορισμό της επιδημιολογίας της φυματίωσης και τον έλεγχο της σοβαρής αυτής λοίμωξης στη χώρα μας.

## ABSTRACT

### Epidemiology of pulmonary tuberculosis among patients of two hospitals in Athens

\*D. HOULOULA,<sup>1</sup> \*N. SKARMOUTSOU,<sup>1,2</sup> E. FAVIOU,<sup>3</sup> E. FAKIRI,<sup>2</sup> S. NIKOLAOU,<sup>3</sup> C. VLETSAS,<sup>2</sup> W. TAMVAKIS,<sup>3</sup> E. PAPAFRANGAS,<sup>2</sup> S. KANAVAKI,<sup>3</sup> G. VOURLI,<sup>1</sup> P.T. TASIOS,<sup>1</sup> N. LEGAKIS,<sup>1</sup> L. ZERVA<sup>1</sup>

*\*The first two authors contributed equally to this paper*

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, <sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, "Sismanoglio" Hospital, Athens, <sup>3</sup>Reference Center for Mycobacteria, "Sotiria" Hospital, Athens, Greece

*Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(1):52–62*

**OBJECTIVE** Despite its profound clinical significance and worldwide resurgence, the epidemiology of pulmonary tuberculosis (TB) among adults in Greece is poorly defined. The goal of this study was to collect relevant epidemiological data from patients diagnosed with TB in the two largest pulmonary hospitals in Athens and to characterize the respective isolates. **METHOD** Demographic, clinical and laboratory data were obtained from 250 TB patients hospitalized consecutively in the "Sotiria" and "Sismanoglio" hospitals. Susceptibility of the respective *Mycobacterium tuberculosis* isolates to five antimycobacterial agents was assessed. All strains originating from "Sotiria" and selected strains from "Sismanoglio" were genotyped by the Mycobacterial Interspersed Repeat Unit (MIRU) method. **RESULTS** Most patients were males (75.6%), residents of Attika (76%), and had pulmonary TB (90.8%), a positive PPD test (86.1%) and a positive acid fast smear (73.2%), while 46.8% were of low socioeconomic status and 31.2% were non-Greek-born. Known risk factors for the development of TB were identified: chronic disease 27.6%, immunosuppression 9.6%, substance abuse 11.2% and

institutionalization 7.6%, while 11.2% had suffered from TB in the past, half of whom were noncompliant to treatment. Non-Greeks more frequently demonstrated low socioeconomic status (66.7% and 37.8%, respectively,  $P < 0.001$ ) and resided more frequently in Attika (89.7% and 69.8%, respectively,  $P = 0.001$ ). Greeks more often reported chronic disease (36% and 9%, respectively,  $P < 0.001$ ) and immunosuppression (11.1% and 6.4%, respectively,  $P = 0.025$ ) and were older ( $56.8 \pm 18.3$  and  $34.0 \pm 10.3$  years, respectively,  $P < 0.001$ ), with a bimodal age distribution, characteristic for ongoing transmission of TB in the community. The highest resistance rates were detected for isoniazid (14.4%) and streptomycin (23.6%). Multiresistant TB was identified among 3.5% of native Greeks and 15% of patients originating from Eastern European countries ( $P = 0.012$ ), and was significantly associated with past TB ( $P < 0.001$ ). A total of 145 genotypes were identified among 147 strains isolated from "Sotiria" and only two were clustered (two strains for each cluster). Genotyping of all strains originating from institutionalized patients revealed a TB outbreak involving seven patients who resided in three institutions for mental disorders. **CONCLUSIONS** This report constitutes the first description of the epidemiology of pulmonary TB and the first documentation of an outbreak of TB among adults in Greece.

**Key words:** Attika, Epidemiology, Genotyping, Resistance, Tuberculosis

## Βιβλιογραφία

1. NGUYEN LN, GILBERT GL, MARKS GB. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Respirology* 2004, 9:313–319
2. HAAS DW. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000:2567–2607
3. DROBNIIEWSKI F, BALABANOVA Y, COKER R. Clinical features, diagnosis, and management of multiple drug-resistant tuberculosis since 2002. *Curr Opin Pulm Med* 2004, 10:211–217
4. BARNES PF, CAVE DM. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003, 349:1149–1156
5. VAN EMDEN JDA, CAVE MD, CRAWFORD JT, DALE JW, EISENANCH KD, GICQUEL B ET AL. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993, 31:406–409
6. MAZARS E, LESJEAN S, BANULS AL, GILBERT M, VINCENT V, GICQUEL B ET AL. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:1901–1906
7. SUPPLY P, LESJEAN S, SAVINE E, KREMER K, VAN SOOLINGEN D, LOCHT C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J Clin Microbiol* 2001, 39:3563–3571
8. <http://www.keel.org.gr>
9. ΓΙΑΤΡΟΜΑΝΩΛΑΚΗΣ Ν, ΜΠΑΧΛΙΤΖΑΝΑΚΗΣ Ν. Επιδημιολογία της φυματίωσης. Στο: Κατής Κ, Τουμπής Μ, Πατενταλάκης Μ, Παμπουδάκης Π, Καρβουνάς Ν, Κωνσταντίνου Κ και συν (Συντ.) *Φυματίωση*. Εκδόσεις Ελληνικής Πνευμονολογικής Εταιρείας, Αθήνα, 1997:57–80
10. BOUROS D, DEMOILIOPOULOS J, PANAGOY P, YIATROMANOLAKIS N, MOSCHOS M, PARASKEVOPOULOS A ET AL. Incidence of tuberculosis in Greek armed forces from 1965–1993. *Respiration* 1995, 62:336–340
11. SPYRIDIS P, TSOLIA M, GELESME A, MOUSTAKI M, SPYRIDIS N, SINANIOTIS C ET AL. The impact of Greece's childhood tuberculosis screening program on the epidemiological indexes in the greater Athens area. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003, 7:248–253
12. METCHOCK B, NOLTE FS, WALLACE RJ Jr. *Mycobacteria*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, DC, 1999:399–437
13. CANETTI G, FROMAN S, GOSSET J, HAUDUROY P, MIROSLAV A, MAHLER HT ET AL. *Mycobacteria: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance*. *Bull WHO* 1963, 29:565–578
14. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardiae*, and other aerobic *Actinomycetes*. Approved standard. M24-A. Wayne, Pennsylvania, 2003
15. SELANDER RK, CAUGANT DA, OCHMAN H, MUSSER JM, GILMOUR MN, WHITTAM TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986, 51:873–884
16. HUNTER PR, GASTON MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988, 26:2465–2466
17. THORSON A, DIWAN VK. Gender inequalities in tuberculosis: Aspects of infection, notification rates, and compliance. *Curr Opin Pulm Med* 2001, 7:165–169
18. GUTIERREZ MC, VINCENT V, AUBERT D, BIZET J, GAILLOT O, LEBRUN L ET AL. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998, 36:486–492

19. DIEHL R, RUESCH-GERDES S, NIEMANN S. Molecular epidemiology of tuberculosis among immigrants in Hamburg, Germany. *J Clin Microbiol* 2004, 42:2952–2960
  20. DAHLE UR, SANDVEN P, HELDAL E, CAUGANT DA. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J Clin Microbiol* 2001, 39:1802–1807
  21. BAUER J, YANG Z, POULSEN S, ANDERSEN A. Results from 5 years of nationwide DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in a country with a low incidence of *M. tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 1998, 36:305–308
  22. VAN SOOLINGEN D, BORGDORFF MW, DE HAAS PEW, SEBEK MMGC, VEEN J, DESSENS M ET AL. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: A nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis* 1999, 180:726–736
  23. BRUDEY K, GORDON M, MOSTROM P, SVENSSON L, JONSSON B, SOLA C ET AL. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Western Sweden. *J Clin Microbiol* 2004, 42:3046–3051
  24. ΝΙΚΟΛΑΟΥ Σ, ΚΑΝΑΒΑΚΗ Σ, ΚΑΡΑΜΠΕΛΑ Σ, ΣΚΡΟΥΜΠΕΛΛΟΥ Α, ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ Π, ΠΑΠΑΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Α ΚΑΙ ΣΥΝ. Μελέτη της αντοχής αντιφυματικών φαρμάκων πρώτης επιλογής σε Έλληνες, αλλοδαπούς και ομογενείς (1993–2002). Ετήσιο 30ό Πανελλήνιο Συνέδριο, Αθήνα, 2004:59 (Τόμος Περιλήψεων)
  25. FRIEDEN TR, STERLING T, PABLOS-MENDEZ A, KILBURN JO, CAUTHEN GM, DOOLEY SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993, 328:521–526
  26. SOLA C, FILLIOL I, LEGRAND E, LESJEAN S, LOCHT C, SUPPLY P ET AL. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* 2003, 3:125–133
  27. COWAN LS, MOSHER L, DIEM L, MASSEY JP, CRAWFORD JT. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J Clin Microbiol* 2002, 40:1592–1602
  28. GLYNN JR, VYNNYCKY E, FINE PE. Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques. *Am J Epidemiol* 1999, 149:366–371
- Corresponding author:*
- L. Zerva, Laboratory of Clinical Microbiology, “Attikon” Hospital, 1 Rimini street, GR-112 10 Chaidari, Greece  
e-mail: louzerva@otenet.gr
-