

2004. 4. évfolyam 3. szám

Tartalom:

Megemlékezés Dr. Gadóné Dr. László Veráról

A methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* epidemiológiája
Magyarországon 2003-ban

A 2003. évi OEK bakteriológiai surveillance adatok elemzése
2. rész: *Enterococcus spp.*

A vancomycin rezisztens enterococcus (VRE) molekuláris
vizsgálata és első járványos előfordulása Magyarországon

A 2003. évi OEK bakteriológiai surveillance adatok elemzése
3. rész: *Escherichia coli* és *Klebsiella spp.*

ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* és *K. oxytoca*
járványtörzsek molekuláris-epidemiológiai tipizálása

Dr. Gadóné Dr. László Vera okleveles mikrobiológus, bakteriológus, a biológiai tudomány kandidátusa 2004. október 4-én váratlanul elhunyt.

1959. november 1-től, 1997. december 31-ig dolgozott az Országos Közegészségügyi Intézet Fágosztályán.

A „*Shigella flexneri* baktériumok, fágok és R plazmidok köcsönhatása” című kandidátusi értekezésén kívül, munkásságának fő területe a hazai gyakori *Salmonella* fajok epidemiológiai célra történő tipizálása volt. A járványügyi szempontból legjelentősebb *S. Enteritidis* tipizálására módszert dolgozott ki, melyet több ország laboratóriumában is alkalmaztak. Az általa bevezetett módszerrel kapott adatok elemzéséből jelentős epidemiológiai következtetéseket lehetett levonni a hazai salmonella fertőzések változásának hátteréről.

Külön kiemelendő munkásságának az az iránya, amelynek köszönhetően kimutatta a hazai humán megbetegedések állati eredetének sokrétűségét.

Bevezette a *Salmonella* diagnosztikába a legkorszerűbb genetikai módszereket, a plazmidok jellemzését és szerepét a fertőzések terjedésében.

Tudása, szakmaszeretete, lelkiismeretes munkája példaként szolgált a fiatal munkatársaknak. Sokan köszönhetjük Neki, a gyakran türelmet és kitartást kívánó munka örömét.

Kegyelettel őrzik emlékét, és szomorú szívvel hajtanak fejet a

„Johan Béla” Országos Epidemiológiai Központ és a Fágtypizálási és molekuláris epidemiológiai osztály volt és jelenlegi munkatársai.

A methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* epidemiológiája Magyarországon 2003-ban.

Az Országos Epidemiológiai Központ Bakteriológiai osztálya több mint három évtizede gyűjt adatokat a fontosabb kórokozók antibiotikum rezisztenciájára vonatkozóan. Az évi jelentésekben közölt adatok esetében azonban nem volt megoldható az u. n. „tisztított” statisztikai feldolgozás, amely egy betegről csak egyetlen adott speciesbe tartozó, ill. adott rezisztenciát mutató kórokozó izolálását veszi figyelembe.

A 2001-ben indult mikrobiológiai surveillance, a korábbi gyakorlattal ellentétben, a laboratóriumok által kiadott pozitív eredményeket gyűjt elektronikus formában, ami lehetővé teszi mind a „tisztított” statisztikai feldolgozás elvégzését, mind a laboratóriumok által kiadott leletek esetleges hibáinak felderítését és korrekcióját. A mikrobiológiai surveillance az évek folyamán fokozatosan bővült és 2003-ra már 31 laboratórium adatait gyűjtötte össze az ország legkülönbözőbb részeiből, így az eredmények ekkortól már reprezentatívnak tekinthetők.

A methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) előfordulására vonatkozó adatgyűjtést kiemelkedő fontosságúnak érezzük, ugyanis az egyik leggyakoribb nosocomialis patogénről van szó, melynek incidenciája Európa legtöbb országában jelenleg is emelkedőben van (1). A mikrobiológiai surveillance adatai alapján előfordulása Magyarországon 2003-ban 4.2% volt /1.4% a járó- és 8.2% a fekvő betegek között/. Az alábbiakban, táblázatokban mutatjuk be az MRSA incidenciáját anyagfajták, kórházi osztályok és korcsoport szerint, valamint földrajzi megoszlás alapján. Ismertetjük továbbá azokat a szekvencia tipizálási eredményeket, amelyek révén első ízben vált Magyarországon követhetővé a különböző nemzetközi és hazai MRSA klonok elterjedése.

Az 1. táblázatban az MRSA-nak az egyes anyagfajtákban megfigyelt arányát tüntettük fel.

1. táblázat

Az MRSA aránya egyes anyagfajtákból izolált *Staphylococcus aureus* törzsek között (2003)

Haemocultura, liquor	14,9 %	(1004 törzs)
Drain	26,3 %	(266 törzs)
Genny	6,3 %	(5629 törzs)
Fülváladék	1,0 %	(788 törzs)
Bronchus	15,1 %	(902 törzs)
Sebváladék (járóbeteg)	3,8 %	(1559 törzs)
Sebváladék (fekvőbeteg)	8,9 %	(2026 törzs)
Orr-torok váladék (járóbeteg)	0,6 %	(12797 törzs)
Orr-torok váladék (fekvőbeteg)	6,7 %	(3688 törzs)

Mint a táblázatból látható az egyes anyagfajták között igen nagyok a különbségek az MRSA előfordulását illetően. Általánosságban elmondhatjuk, hogy az invazív fertőzésekből került leggyakrabban izolálásra MRSA. A legmagasabb a tenyésztési arány a draineik esetében /26.3%/, amit a bronchusból, valamint a haemoculturából és liquorból történő izolálások száma követ /15.1%, ill. 14.9%/.

A 2. táblázatban az MRSA-nak különböző kórházi osztályokon észlelt előfordulását mutatjuk be.

2. táblázat

Az MRSA előfordulása különböző kórházi osztályokon Magyarországon 2003-ban

Belgyógyászat	9,4 %	(1110 törzs)
Csecsemő és gyermekosztály	0,8 %	(2190 törzs)
Fertőző osztály	18,4 %	(457 törzs)
Intenzív osztály	22,8 %	(1723 törzs)

Fül-orr-gégészet	1,2 %	(163 törzs)
Sebészet	13,7 %	(1524 törzs)
Szülészet-nőgyógyászat	1,9 %	(473 törzs)
Traumatológia	7,9 %	(2369 törzs)

A hazai kórházi osztályok közül legmagasabb az MRSA előfordulási aránya az intenzív osztályokon /22.8%/, amit a fertőző, ill. a sebészeti osztály követ /18.4%, ill. 13.7%/. Kedvezőnek mondható, hogy a csecsemő és gyerek-, a szülészeti-, valamint a fül-orr-gégészeti osztályokon alacsony az MRSA incidenciája /0.8%, 1.9% ill. 1.2%/.

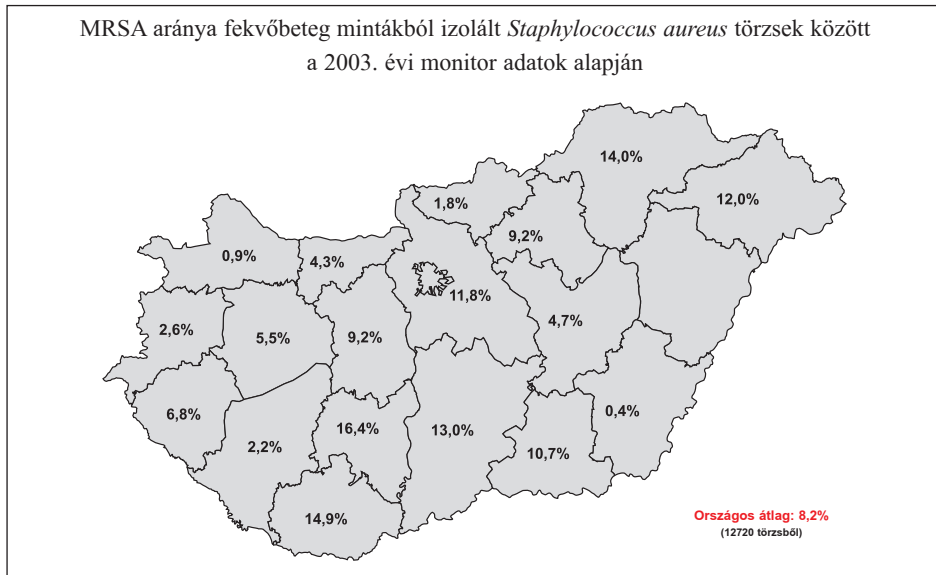
3. táblázat

Az MRSA előfordulása Magyarországon korcsoportos bontásban 2003-ban

Korcsoport (év)	MRSA aránya a <i>S. aureus</i> törzsek között (%)	
0 – 4	0,6	(3298 törzs)
5 – 14	0,5	(5664 törzs)
15 – 24	1,5	(3721 törzs)
25 – 64	6,6	(12859 törzs)
> 65	10,4	(5544 törzs)
nem ismert	1,9	(1302 törzs)
átlag	4,2	(32388 törzs)

Az MRSA korcsoportos megoszlása (3. táblázat) az egyes kórházi osztályokon tapasztalt incidenciát tükrözi: 14 év alatt az MRSA fertőzés ritka a betegek között, míg az idősebb korosztályok esetében – akik közül az intenzív, valamint sebészeti osztályok betegeinek többsége kikerül – jóval magasabb a kórokozó előfordulási aránya.

Mivel az MRSA incidenciája egyelőre alacsony a járóbetegek között Magyarországon az 1. ábrán a fekvőbetegekből izolált törzsek területi megoszlását mutatjuk be.



A fekvőbetegekből izolált MRSA törzsek területi megoszlása jelentős eltéréseket mutat hazánkban. Mint a térképen látható az incidencia a legmagasabb Tolna megyében /16.4%/, amit Baranya-, Borsod- és Bács-Kiskun megye követ /14.9%, 14.0%, 13.0%/. Magas még az előfordulási arány Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében, valamint Budapesten /12.0%, ill. 11.8%/. Igen alacsony ugyanakkor az incidencia Békés- és Győr-Sopron megyében /0.4%, ill. 0.9%/.

A hazai MRSA törzsek szekvencia tipizálása

A Mikrobiológiai Körlevél 2003. 4. számában /3. évfolyam/ tájékoztatást adtunk az Európai Antibiotikum Rezisztencia Surveillance Rendszer /EARSS/ MRSA adatairól (2). Az EARSS által gyűjtött invazív fertőzésből származó adatok alapján az elmúlt két évben jelentősen emelkedett Magyarországon az MRSA incidenciája (2). Az előfordulás 2001-ben 4.7 %; 2002-ben 9.0%; 2003-ban pedig 14.9% volt (1). Felmerül a kérdés, milyen MRSA törzsek terjedtek el Magyarországon, ill. miért következett be az említett emelkedés a kórokozó előfordulásában. Az MRSA törzsek tipizálására számos módszer áll rendelkezésre: fág tipizálás, pulsed-field elektroforézis, „arbitrarily primed” PCR,

rep-PCR, multilocus sequence typing (MLST) (3). Az említett módszerek közül a legérzékenyebb a PFGE, amely az egyes törzsek között meglévő igen kis különbségeket is képes kimutatni. Hátránya ugyanakkor, hogy nehezen standardizálható, ami problémát okozhat a különböző helyszíneken végzett vizsgálatok összehasonlításánál. További hátránya, hogy rendkívül érzékeny; olyan törzsek között is jelentős különbséget mutathat ki, amelyek valójában rokonok és azonos klonba tartoznak. Ezen tulajdonságai miatt a gyakorlatban elsősorban halmozott kórházi fertőzések járványügyi kivizsgálására használják, amikor a vizsgálatok egyetlen laboratóriumban azonos körülmények között történnek és az izolált kórokozók közötti teljes azonosság megállapítására irányulnak. Ugyanakkor a patogének nagyobb csoportjainak országos, vagy nemzetközi összehasonlítására nem mindig alkalmazható biztonságosan. Ezért terjed helyette egyre inkább az u. n. szekvencia tipizálás, az MLST. Az MLST vizsgálat lényege, hogy kiválasztanak hét olyan génszakaszt, amelyek az adott species minden tagjában megtalálhatók; ezeket PCR-rel amplifikálják, és a kapott szekvenciákat összehasonlítják. A kiválasztott gének mutációs rátája nem szabad, hogy túl magas, vagy túl alacsony legyen, mert csak így nyílik lehetőség a genetikai változékonyság követésére oly módon, hogy közben a kis mértékben megváltozott törzsek közötti rokonság észlelésének képessége sem vesz el. Az MLST vizsgálat eredményességének előfeltétele egy-egy species esetében, hogy a kiválasztott génszakaszok valóban megfeleljenek az említett feltételeknek. Ezt számos fajnál, többek között a *Staphylococcus aureus*nál is, sikerült megvalósítani. Az MLST módszer további nagy előnye, hogy a különböző laboratóriumokban végzett vizsgálatok tökéletesen összehasonlíthatók: a megfelelő technikával végzett szekvenálási vizsgálatok minden laboratóriumban megbízható, egymással összevethető eredményt adnak a nukleotid sorrendre vonatkozóan. Ezért az MLST a legalkalmasabb eljárás országos, vagy nemzetközi összehasonlító tipizálási vizsgálatok végzésére. Hátránya ugyanakkor, hogy nem olcsó, így az MLST vizsgálatot csak korlátozott számú, lehetőleg az epidemiológiai szempontból legfontosabb törzseknél szokták elvégezni. Magyarországon még nem került sor MLST vizsgálat végzésére, ugyanakkor az EARSS project vezetőjének dr. Hajo Grundmannak segítségével lehetőségünk nyílt 36 hazai MRSA törzs Hollandiában történő MLST tipizálására. A törzsek között az elmúlt három év szinte valamennyi hazai MRSA járványából szerepelt kórokozó. Bár egyes törzsek vizsgálata még folyamatban van, a

már teljes egészében rendelkezésre álló 32 törzs tipizálási eredményét a kérdés fontosságára való tekintettel az alábbiakban ismertetjük. Beszámolunk továbbá a törzsek oxacillin rezisztenciáért felelős *mecA* gén szakaszainak tipizálási eredményeiről is, amelyeket ugyancsak Hollandiából kaptunk. A *mecA* gén szerinti tipizálás szintén a nukleinsav szekvencia vizsgálatán alapszik és a rezisztencia gén, valamint környezete nukleinsav sorrendjét hasonlítja össze. A vizsgálatot az MLST-vel ellentétben nem amplifikációval és szekvenálással, hanem hibridizációval végzik. Az MRSA klonok meghatározásakor az MLST és *mecA* tipizálási eredményt kombinálni szokták, ahol az MLST típust arab, a *mecA* típust pedig római számmal jelölik.

Az alábbi két táblázatban a hazai MRSA törzsek MLST és *mecA* típusait együttesen tüntettük fel; a 4. táblázatban a kórokozók földrajzi-, az 5. táblázatban pedig időbeli megoszlását mutatjuk be.

4. Táblázat

Hazai MRSA szekvencia típusok területi megoszlása

Izolálás helye	5I.	5II.	5IV.	8III.	228I.	239III.
Budapest		8	2		6	1
Pest megye		2			1	
Bács-K. m.			1			
Fejér m.					2	
Nógrád m.		1				
Borsod m.		1			1	
Békés m.						1
Szab.-Sz. m.						1
Hajdú-B. m.						1
Veszprém m.		1				
Zala megye	1					
Somogy m.				1		

5. Táblázat

Hazai MRSA MLST típusok megoszlása 2001-2003-ban

	2001	2002	2003	Összesen
5/I			1	1
5/II	5	3	5	13
5/IV			3	3
228/I	1	1	8	10
239/III	2	2		4
8/III			1	1
Összesen	8	6	18	32

Mint a táblázatokból látható Magyarországon több MRSA klon elterjedt, de egyedi izolálások is előfordulnak. A leggyakoribbnak az 5II-es klon bizonyult, amely az egyik legjobban ismert nemzetközi MRSA klon. Az 5II-es klon az egész világon megtalálható és mivel először az Egyesült Államok keleti partján, ill. Japánban írták le nagyszámú előfordulását New York/Japán klonnak nevezik (4,5). Az egész világon elterjedt MRSA klonok közül megtalálható még Magyarországon a Brazil klon /239III/, amelynek egyik variánsát, mint Hungarian klont írták le az 1990-es években (6). Feltehető, hogy a jelenleg hazánkban előforduló 239III-as törzsek ebbe a már korábban is kimutatott Hungarian klonba tartoznak. A harmadik globális klon, amely Magyarországon megtalálható az 5IV-es típusú u. n. „pediatric” klon (4,5). A várakozásnak megfelelően mind a három globális klonba tartozó törzsek kimutathatók voltak a fővárosban, amely leginkább érintett a nemzetközi személyforgalomban. A New York/Japán klonba tartozó törzsek döntő részben; a „pediatric” klonba tartozók pedig kizárólag itt fordultak elő. Feltűnő ugyanakkor, hogy a Brazil/Hungarian klon törzsei elsősorban a keleti országrészben kerültek izolálásra.

Ugyancsak nemzetközi, bár nem globális MRSA klonnak számít a 228I. Ezt a klont először Dél-Németországban írták le (4) és nevét is innen kapta, később azonban igen nagy

számában izolálták Olaszországban is (7). Mint az 5. táblázatból látható, az ebbe a klonba tartozó törzsek döntő részben 2003-ban terjedtek el Magyarországon. A törzs hirtelen nagyszámú budapesti előfordulása külföldi behurcolásra utal. A 228I-es klon behurcolás révén való gyors elterjedését úgy tűnik, a nemzetközi adatok is alátámasztják: 2002-2003-ban nemcsak Magyarországon, hanem a szomszédos Ausztriában is a hazaihoz hasonló emelkedés következett be az MRSA incidenciájában (1,2). Mivel a 228I-es klonba tartozó törzsek mindenekelőtt Ausztrián át kerülhettek Dél-Németországból, ill. Olaszországból Magyarországra – bár egyelőre nem rendelkezünk osztrák MLST adatokkal az elmúlt két évről – joggal tételezhetjük fel, hogy a „dél-német” klon kelet felé történő terjedése okozott jelentős változást a szomszédos országban is. Ugyanakkor, mint a 4. táblázatból látható Magyarországon a „pediatric” klonba tartozó törzsek, bár kisebb számban, de szintén hozzájárulhattak az MRSA járványügyi helyzetének romlásához.

Igen érdekes a ritka 5I klonba tartozó törzs Zala megyében történt izolálása, ugyanis az ilyen típusú törzseket a világon eddig csak három országban írták le, amelyek közül viszont az egyik Szlovénia (4). Mivel Zala az egyetlen magyar megye, amely határos Szlovéniával, nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a törzset ebből az országból hurcolták be.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy Magyarországon az MRSA járványügyi helyzete igen nagy eltéréseket mutat mind földrajzilag, mind a kormegoszlás, ill. az egyes kórházi osztályokon való előfordulás szempontjából. A hazai törzsek MLST tipizálási eredményei igazolják, hogy az országban több nemzetközi MRSA klon terjedt el, amelyek közül a „dél-német” klon nagymértékben járult hozzá az epidemiológiai helyzet utóbbi időben bekövetkezett romlásához. Igen fontosnak érezzük a járványügyi helyzet további monitorozását, valamint a higiénés előírások, mindenekelőtt az újonnan felvett betegek szűrésére és szükség esetén izolálására vonatkozó ajánlások, szigorú betartását a helyzet további rosszabbodásának megakadályozása érdekében.

Füzi Miklós, Gacs Mária, Böröcz Karolina, Tóth Ákos, Pászti Judit, Végh Zsolt, Hajo Grundmann

Irodalom:

1. European Antimicrobial Resistance Surveillance. <http://www.earss.rivm.nl>.
2. Füzi, M.: Beszámoló az „European Antimicrobial Resistance Surveillance System”/EARSS/2003. évi konferenciáján való részvételről. Mikrobiológiai Körlevél 2003: 3. 2-6.
3. Trindade, P. A. és mtsai.: Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2003, 7: 32-43.
4. Enright, M. C. és mtsai.: The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2002, 99: 7687-92.
5. Howe, R. A. és mtsai.: Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. Emerging Infectious Diseases 2004, 10: 855-57.
6. de Lencastre H. és mtsai.: Wide geographic distribution of unique methicillin-resist *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. Clinical Microbiology and Infection 1997, 3: 289-296.
7. Mato, R. és mtsai.: Clonal types and multidrug resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) recovered in Italy during the 1990s. Microbial Drug Resistance. 2004, 10: 106-113.

A 2003. évi OEK bakteriológiai surveillance adatok elemzése 2. rész

Enterococcus spp.

Folytatva a 2003 évi surveillance adatok értékelését, e számban részletesen az enterococcusokkal kapcsolatos adatokat értékeljük, nemcsak a miatt, mivel erről még nem esett szó, de az enterococcus témát nagyon aktuálissá és fontossá teszi a közelmúltban felderített, kivizsgált és molekuláris vizsgálatokkal is igazolt első hazai vancomycin rezisztens enterococcus okozta járvány. (Erről bővebben a surveillance adatok értékelése után.) Nagyon nehéz feladat az enterococcusokkal kapcsolatos adatok értékelése, mivel az eredmények elsősorban azt tükrözik, milyen sok nehézség van az identifikálás és az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok értékelésében. Az adatok egyértelműen azt mutatják, hogy az enterococcusok nagy számban izolálhatók a különböző vizsgálati anyagokból, s gyakran fordulnak elő az invazív infekciókból származó mintákban is. Az 1. táblázatban látható, hogy a haemokulturákból izolált kórokozók gyakorisági sorrendjében a 3. helyet foglalják el. Hasonló adatokkal találkozhatunk irodalmi közleményekben is.(1)

1. táblázat Haemokulturákból kitenyésztett baktériumok gyakorisági sorrendje a 2003. évi bakteriológiai surveillance adatok alapján*

<i>Staphylococcus aureus</i>	1399	12,31 %
<i>Escherichia coli</i>	1134	9,98 %
<i>Enterococcus spp.</i>	621	5,46 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	470	4,14 %
<i>Acinetobacter baumannii</i>	283	2,49 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	253	2,23 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	240	2,11 %
<i>Streptococcus alfa-hemolizáló</i>	181	1,59 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	171	1,50 %
Összesen	11364	100 %

* *Staphylococcus coagulase* negatív nélkül

A genuson belül az egyes speciestek előfordulási gyakoriságát tekintve, az identifikálási gyakorlat ismert pontatlanságai ellenére, az arányok közel reálisak. A species meghatározás bizonytalanságát tükrözi az *Enterococcus spp.*-ként kiadott törzsek magas száma (2. táblázat).

2. táblázat Az *Enterococcus* speciestek anyag típusonkénti előfordulása a 2003. évi bakteriológiai surveillance adatok alapján*

anyag típus	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. pseudoavium</i>	összesen
genny	1808	1078	160	13	10	7	5	4	2	2	2	0	3091
seb	1247	389	51	3	1	2	0	0	1	0	0	0	1694
haemokultúra	645	344	83	3	2	3	1	1	0	0	0	0	1082
liquor	35	18	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57
egyéb összes	7573	2108	143	96	5	2	2	2	1	2	2	1	10009
összesen	11308	4009	441	115	18	14	8	7	4	4	4	1	15933

* vizelet nélkül

A speciestek előfordulási arányának változását a jóval rezisztensebb *E. faecium* előretörését jelzik az irodalmi adatok (1). A SENTRY Antimicrobial Surveillance program szerint a klinikai izolátumokban 57,2 – 76,8% az *E. faecalis*, és 4,6 – 19,3% az *E. faecium* törzsek előfordulási gyakorisága világszerte.

A hazai laboratóriumoknak a két leggyakoribb species pontosabb fenotípusos meghatározására kellene törekedni, a nehézségek ellenére is. Az enterococcus infekciók növekvő száma és a különböző rezisztencia mechanizmusok egyre gyakoribb előfordulása indokolja ezt. Mint tudjuk, az ampicillin rezisztencia elsősorban az *E. faecium*ra jellemző, de ez a tulajdonság nem kizárólagos, másrészt lehetnek ampicillinre érzékeny törzsek is. A vancomycin rezisztencia típusok is jellemzőek lehetnek egyes speciestekre. Lényeges meghatároznunk a *E. casseliflavus*/*E. flavescens* és *E. gallinarum* törzseket, hogy az ezekre a speciestekre jellemző, természetes VanC típusú rezisztenciát differenciálni tudjuk a szerzett VanB típusú rezisztenciától. A két típus rezisztencia képe azonos lehet, de kórházhigiénés jelentőségük nagyon különböző.

A hagyományos, s laboratóriumonként változó mélységű identifikálási eljárásokon túl, az utóbbi időben egyre szélesebb körben használt kereskedelmi kitek használata sem tette lényegesen pontosabbá a species meghatározásokat. Különböző kereskedelmi kitekkel végzett identifikálások eltérő eredményeket adhatnak, ahogy a továbbiakban a részletes eredmények is mutatják.

Az alábbiakban bemutatjuk a mai is elfogadott hagyományos vizsgálatokon alapuló **Facklam** féle identifikálási sémát (2), s a továbbiakban a laboratóriumunkba beküldött törzsek többféle kereskedelmi kittel való vizsgálatát, amelyek gyakran nem vezettek egyértelmű eredményre. (3 – 11. táblázat)

3. táblázat Percentages of positive reactions of study cultures in tests for identification of enterococci

	% Positive reactions of strains of the genus		
	<i>Enterococcus</i> (n=188)	<i>Lactococcus</i> (n=3)	<i>Leuconostoc</i> (n=6)
Gram-positív cocci	100	100	100
Group D antigen	77	0	17
Bile-esculin reaction	100	100	100
Growth in 6,5 % NaCl broth	100	100	100
Vancomycin susceptibility	99	100	0
Gas from glucose	<1	0	100
Pyrrolidonylarylamidase	100	33	0

4. táblázat Key tests for identification of *Enterococcus* groups

Species	Group	Reaction (% positive)			
		Mannitol	Sorbitol	Sorbose	Arginine
<i>E. avium</i>	I.	100	97	97	0
<i>E. raffinosus</i>					
<i>E. melodoratus</i>					
<i>E. pseudoavium</i>					
<i>E. faecalis</i>	II.	99	V (63)	0	94

Species	Group	Reaction (% positive)			
		Mannitol	Sorbitol	Sorbose	Arginine
<i>E. solitarius</i>					
<i>E. gallinarum</i>					
<i>E. faecium</i>					
<i>E. casseliflavus</i>					
<i>E. mundtii</i>					
<i>E. durans</i>	III	7	0	0	100
<i>E. hirae</i>					
<i>E. faecalis</i> *					

* (assacharolitic variant)

V variable reactions,

5. táblázat Identification of group I *Enterococcus* species

Species	Reaction (%positive)	
	Arabinose	Raffinose
<i>E. avium</i>	99	0
<i>E. raffinosus</i>	100	100
<i>E. melodoratus</i>	0	100
<i>E. pseudoavium</i>	0	0

6. táblázat Identification of group II *Enterococcus* species

Species	Reaction (% positive)				
	Arabinose	Sorbitol	Lactose	Motility	Pigment
<i>E. faecalis</i>	0	96	100	0	0
<i>E. solitarius</i>	0	100	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	100	0	100	100	0
<i>E. faecium</i>	100	V (29)	97	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	100	V (50)	100	100	100
<i>E. mundtii</i>	100	V (50)	100	0	100

7. táblázat Identification of group III *Enterococcus* species

Species	Reaction (% positive)		
	Sucrose	Raffinose	Pyruvate
<i>E. durans</i>	0	0	0
<i>E. hirae</i>	88	75	0
<i>E. faecalis</i> *	0	0	64

*Assacharolytic variant

8. táblázat Percentages for positive reactions in additional tests used to differentiate *Enterococcus* species

Strain	% Positive for:									
	Acid formation				hippurate hydrolysis	Growth tolerance			VP	Group D antigen
	glycerol	inulin	melibiose	trehalose		10 °C	tellurite	tetrazolium		
<i>E. avium</i>	44	0	50	100	0	66	0	78	62	32
<i>E. raffinosus</i>	93	0	100	100	33	27	0	33	66	40
<i>E. malodoratus</i>	0	0	100	100	0	100	0	0	0	100
<i>E. pseudoavium</i>	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	93	0	4	99	24	99	93	99	89	91
<i>E. solitarius</i>	100	0	25	100	100	75	0	50	75	100
<i>E. gallinarum</i>	0	0	100	100	62	100	8	46	62	100
<i>E. faecium</i>	0	0	81	100	23	97	3	19	89	68
<i>E. casseliflavus</i>	63	75	100	100	0	75	0	63	25	100
<i>E. mundtii</i>	0	0	100	100	0	100	50	100	100	100
<i>E. durans</i>	0	0	75	100	33	100	0	17	100	75
<i>E. hirae</i>	0	0	88	100	13	100	0	38	100	63
<i>E. faecalis</i> *	0	0	0	75	100	100	0	100	0	100

9. táblázat *Enterococcus* spp. API és Crystal identifikálási eredményeinek összehasonlító táblázata

API eredmény	Crystal eredmény							összesen
	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. gallinarum</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>M. sedentarius</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	3			28				31
<i>Enterococcus faecium</i> / <i>E. gallinarum</i>	1							1
<i>Enterococcus gallinarum</i>				8				8
<i>Enterococcus faecalis</i>			3					3
<i>Aerococcus viridans</i>	3			2		1		6
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2			5				7
<i>Enterococcus gallinarum</i> / <i>E. faecium</i>	1			1				2
<i>Enterococcus durans</i>		1		1				2
<i>Enterococcus avium</i>	1							1
<i>Enterococcus durans</i> / <i>E. faecium</i>					1			1
<i>Streptococcus mitis</i>							1	1
összesen	11	1	3	45	1	1	1	63

10. táblázat *Enterococcus* spp. REMEL és API identifikálási eredményeinek összehasonlító táblázata

API eredmény	Remel eredmények									összesen
	<i>Aerococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. mundtii</i>	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. mundtii</i>	<i>E. durans</i> / <i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. intermedius</i>	
<i>Aerococcus viridans</i>			1							1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1		1			2				4
<i>Enterococcus faecium</i>		22	17	3			1			43
<i>nem vizsgált</i>				1	1			2	1	5
összesen	1	22	19	4	1	2	1	2	1	53

11. táblázat *Enterococcus spp.* REMEL és Crystal identifikálási eredményeinek összehasonlító táblázata

Crystal eredmény	Remel eredmény							összesen
	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. mundtii</i>	<i>E. durans</i> / <i>E. hirae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>S. intermedius</i>	
<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. gallinarum</i>		1			1			2
<i>Enterococcus faecalis</i>				1		1		2
<i>Enterococcus faecium</i>	12	3				1		16
<i>Enterococcus hirae</i>			1					1
nem azonosítható							1	1
összesen	12	4	1	1	1	2	1	22

Csak az enterococcusokra jellemző sajátságok, és a kereskedelmi kitek együttes vizsgálata adhat fenotípusosan megközelítően jó eredményt. Igazán pontos species meghatározást csak molekuláris módszerekkel kaphatunk. Olasz szerzők összehasonlították a fenotípusos, a multiplex PCR és 16S rDNS vizsgálatokkal való identifikálást. A 279 vizsgált törzsből 26 fenotípusosan meghatározott species nem egyezett a 16S rDNS vizsgálat eredményével, 6 ezek közül genus szinten sem egyezett, a streptococcus, lactobacillus, leuconostoc, és aerococcusok közé tartoztak. *E. faecium*-nak identifikált 9 izolátum molekulárisan *E. faecalis*-nak bizonyult. A fenotípusosan *E. faecium*-nak identifikáltak eredménye volt leggyakrabban eltérő. Megállapították, hogy a kereskedelmi kitek használatát, vagy az automata meghatározásokat gyakran kell kiegészíteni további hagyományos vizsgálatokkal. (PYR reakció, epe-eszkulin és növekedés 6.5%-os NaCl-ban, mozgás, pigment termelés) (3). A molekuláris módszerek használata a mindennapi rutin vizsgálatokban nem valósítható meg, és nem is indokolt, azonban a súlyosabb infekciókból származó izolátumokat, különösen, ha az identifikálási és antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredménye szokatlan, nem várt eredményt ad, fontos tovább vizsgálni.

A molekuláris vizsgálatok elengedhetetlenek, ha a törzs PYR pozitív, vancomycin mérsékelt vagy rezisztens, növekszik a vancomycin screen lemezen és a mozgás vizsgálata negatív.

Ezúton köszönjük a laboratóriumoknak az izolált *E. faecium* (és egyéb *Enterococcus spp.*) törzsek beküldését.

A továbbiakban kérünk minden vancomycin 4-256 µg/ml MIC értékű, vagy a 6 µg/ml vancomycin tartalmú BHI agar „screen” lemezen növekedő enterococcust beküldeni meg erősítésre és további molekuláris vizsgálatra. Külön sürgős jelzést kérünk, ha összefüggő két vagy több törzs egyidejű izolálásáról van szó.

Az enterococcusok antibiotikum érzékenysége

Az enterococcusok közismerten többféle antibiotikummal szemben természetes rezisztenciát mutatnak

Így nem vizsgáljuk enterococcusok esetében a cefalosporinok, standard koncentrációjú aminoglikozidok, aztreonam, clindamycin, (csak diagnosztikus célból, de nem ritkán lehet érzékeny is) oxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazol érzékenységet.

Az ampicillin mellett más béta-laktámok pl. (az amoxicillin/clavulansav, ampicillin/sulbactam, piperacillin, piperacillin/tazobactam és az imipenem) nem nyújtanak előnyt az enterococcusok terápiájában, azonban felhasználhatóak lehetnek a polimikrobiális infekciókban, amikor az enterococcus Gr-negatív baktériumokkal együtt fordul elő.

Három jelentős szerzett rezisztencia-mechanizmus figyelhető meg az enterococcusokban, s ezek kombinációja vezethet ahhoz, hogy olyan törzseket izolálunk, amelyek csak az újabban bevezetésre került antibiotikumokra a quinupristin/ dalfopristin és linezolidra lehetnek érzékenyek.

1. A β-laktámokkal szembeni rezisztencia (PBP5 alteráció)

Csak az ampicillin érzékenység vizsgálata és ampicillinnel szembeni rezisztencia fennállása esetén a béta-laktamáz termelés vizsgálata indokolt, ezek eredményei meghatározzák a többi béta-laktám alkalmazhatóságát.

- a. Ampicillin rezisztencia és béta-laktamáz negatív esetben, – ami nagyon gyakori – azonban a rezisztencia PBP változáson alapul, s így a terápiában a béta-laktámok nem jönnek szóba. Ez utóbbi rezisztencia elsősorban az *E. faeciumok*-ra jellemző. Az *E. faecalis* ampicillin rezisztenciája jelentősen kisebb arányú, mint az *Enterococ-*

cus faecium izolátumoké, ezért a species meghatározás fontos terápiás szempontból is.

b. Ampicillin rezisztencia és béta-laktamáz pozitivitás esetén, – ami ritka – az amoxicillin/ klavulánsav, és az ampicillin/ sulbactam még hatékony lehet.

Ezek után nézzük a 2003 évben izolált enterococcusok és az *E. faecalis*, *E. faecium* ampicillin rezisztenciáját. (12. táblázat)

12. táblázat *Enterococcusok* ampicillin érzékenysége, speciesenkénti bontásban a 2003. évi bakteriológiai surveillance alapján

EREDMENY	érzékeny	mérsékelt	rezisztens	összes
<i>Enterococcus avium</i>	13			13
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	6		1	7
<i>Enterococcus dispar</i>	4			4
<i>Enterococcus durans</i>	107		3	110
<i>Enterococcus faecalis</i>	10673	5	34	10712
<i>Enterococcus faecium</i>	36	5	366	407
<i>Enterococcus gallinarum</i>	7	1	6	14
<i>Enterococcus hirae</i>	4			4
<i>Enterococcus mundtii</i>	7			7
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	1			1
<i>Enterococcus raffinosus</i>	4			4
<i>Enterococcus sp.</i>	3707	10	206	3923
összes	14569	21	616	15206

2. Az aminoglikozidokkal szembeni magas szintű rezisztencia (HLAR)

Nagyobb problémák látszanak a magas szintű aminoglikozid rezisztencia vizsgálatának értékelésében és dokumentációjában, mivel ebben a hazai laboratóriumokban nincs egységes megállapodás.

A terápiában az aminoglikozidoknak, mint közismert csak a β -laktámokkal és glikopeptidekkel való szinergista hatása érvényesül, amennyiben az enterococcus nem rendelkezik magas szintű rezisztenciával velük szemben. Korábban, hogy a klinikusok azt a törzset, amely nem bizonyult magas szinten rezisztensnek ne tekinték önállóan is érzékenynek, mérsékelt érzékenynek jelöltük, amely tulajdonképpen azt jelölte, hogy csak szinergista hatása van. Miután az NCCLS pontosan meghatározza a vizsgálat menetét, ma már remél-

hetően minden laboratórium e szerint vizsgálja az enterococcusok aminoglikozid rezisztenciáját, s a 120 μ g gentamicin és a 300 μ g streptomycin tartalmú korong használata általános. Legalább ilyen fontos, hogy egyértelműen és egységesen jelöljük azt, ha a törzs aminoglikozidra magas szinten rezisztens vagy nem. Javasoljuk, hogy **2004. évtől a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően a magas szintű rezisztenciát nem mutató törzseket HLAR érzékenynek, és a magas szintű rezisztenciával bíró izolátumokat HLAR rezisztensnek adjuk meg.** A HLAR érzékeny mellé célszerű egy kis csillag jelöléssel megjegyzést fűzni: „Csak szinergista hatás”. Tehát *mérsékelt* jelölést a továbbiakban ne használjunk, ha a törzs érzékenysége a 120 μ g tartalmú koronggal a mérsékelt kategóriába esik, azokat az NCCLS ajánlása szerint tovább kell vizsgálni HLAR irányába. A 2003. évi adatok esetében az érzékeny és mérsékelt érzékeny együtt értékelendő **13. és 14. táblázatok.**

13. táblázat *Enterococcus spp.* gentamicin érzékenysége a 2003. évi bakteriológiai surveillance adatai alapján

	db	%
érzékeny	94	0,71%
mérsékelt	10540	79,15%
rezisztens	2682	20,14%
összesen	13316	100,00%

14. táblázat Gentamicin rezisztens *Enterococcus spp.* streptomycin érzékenysége

	db	%
streptomycin érzékeny	14	0,52%
streptomycin mérsékelt	298	11,11%
streptomycin rezisztens	669	24,95%
streptomycin nem vizsgált	1701	63,42%
összesen	2682	100,00%

3. A glikopeptidekkel szembeni rezisztencia (van gén transfer)

Nagyon fontos, hogy ezen a területen a diagnosztika megújuljon. Minden laboratóriumnak arra kell törekednie, hogy a vancomycinnel szemben emelkedett MIC értékű, (mérsékelt vagy rezisztens) enterococcusokat meghatározza. Az enterococcusok vancomycin érzékenységének vizsgálatára az NCCLS a **6 μ g/ml vancomycin tartalmú screen** lemezt ajánlja. Laboratóriumunkban jó tapasztalatokat szereztünk 6 μ g/ml BHI táptalajjal.

Egy lemezre több törzs szuszpenziója felvihető, s minden lemezre szükséges a pozitív ATCC51299, és a negatív ATCC29212 kontroll törzset is ráoltani. Azokat a törzseket, amelyek a screen lemezen növekednek, ki kell szélesíteni V táptalajra, majd a 24 órás tenyészetből **2 McFarland** sűrűségű szuszpenziót készítve, **BHI táptalajon vancomycin és teicoplanin E teszt MIC** meghatározást kell végezni. Ugyanakkor célszerű elvégezni a PYR vizsgálatot, és a mozgás vizsgálatát pl. SIM, vagy más mozgás vizsgálatára alkalmas táptalajban.

Ha a vancomycin és a teicoplanin MIC értéke egyaránt magas, VanA típus a valószínű, ha a vancomycin MIC értéke 4 µg/ml fölött van és a teicoplanin érzékeny, fenotípusosan csak a mozgás és a esetenként a pigment képzés segít eldönteni, hogy VanB vagy VanC típusú-e a rezisztencia. Ezt nagyon lényeges eldönteni elsősorban járványügyi szempontból, mivel a rezisztenciát kódoló *vanA* és *vanB* gének átvihetők, a VanC természetes rezisztencia nem átvihető. Azok a törzsek, amelyek a mozgás vizsgálattal pozitívak és a vancomycin MIC érték a mérsékelt kategóriába esik nagy valószínűséggel az *E. casseliflavus*/*E. flavescens* vagy az *E. gallinarum* (VanC) speciesbe tartoznak, míg a mozgás negatív vancomycin mérsékelt vagy rezisztens és teicoplanin érzékeny törzsek elsősorban VanB típusú *E. faecium*, vagy *E. faecalis*ok lehetnek. Biztosan meghatározni a speciést és a rezisztenciát kódoló géneket, azaz a rezisztencia típusát, csak molekuláris vizsgálatokkal lehetséges. A különböző van-típusok jellegzetességeit mutatja a **15. táblázat**.

15. táblázat Enterococcusok által hordozott leggyakoribb *van* gének jellemzői

Jellemzők	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i> ₁₋₂₋₃
Hordozó speciesek	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC</i> ₁) <i>E. casseliflavus</i> (<i>vanC</i> ₂) <i>E. flavescens</i> (<i>vanC</i> ₃)
Rezisztencia típusa	szerezett	szerezett	természetes
Vancomycin MIC	≥ 64 mg/l	4- 1000 mg/l	2- 32 mg/l
Teicoplanin MIC	≥ 16 mg/l	0,5- 2,0 mg/l	0,5- 1,0 mg/l
Genetikai lokalizáció	gyakran plazmid	gyakran kromoszomális	kromoszomális
Transzferálhatóság	(Tn1546) transposon, mobilis genetikai elemek		nem
Induktor	vancomycin és teicoplanin	csak vancomycin	indukálhatóak

Mutációk következtében	Teicoplanin érzékeny lehet	Teicoplanin rezisztens lehet	
Előzetes vancomycin kezelés következtében		Teicoplanin rezisztens lehet	
Előfordulás Európában	domináns	ritka	nem pontosan ismert
Előfordulás az USA-ban	domináns	lokálisan gyakori	

Ma már a fentiekén kívül *vanD*, *vanE*, *vanG* gén is ismert.

A 2003 évi adatok szerint 31 enterococcus izolátum volt mérsékelt vagy rezisztens vancomycinnel szemben (**16. táblázat**).

16. táblázat Vancomycin mérsékeltén érzékeny és rezisztens *Enterococcus* spp. anyagokéti megoszlása a 2003. évi bakteriológiai surveillance adatai alapján

anyag megnevezése	mérsékelt					rezisztens					összes
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	mérsékelt összesen	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	rezisztens összesen	
boncolási anyag		1			1						1
bronchus									1	1	1
cervix		2			2	1				1	3
ejakulátum		1			1						1
felületi seb						1				1	1
fül			1	1	2						2
genny	2			1	3						3
hasi						1				1	1
hemokultúra		2	1		3				1	1	4
hüvely		1			1						1
seb			1	1	2	2	1	1	4	8	10
sterilitási vizsg.							1			1	1
trachea						1				1	1
vér/kanülből				1	1						1
összesen	2	7	3	4	16	6	2	1	6	15	31

Feltehetőleg ma még ezek az adatok nem egészen korrektek. Együtt vannak ezekben a számokban a megfelelő módon MIC érték alapján meghatározott törzsek, és a korongdiffúzió alapján szűkebb zónát adó izolátumok. Pontosabb képet kapunk, ha a közölt MIC értékeket vizsgáljuk. (17. táblázat)

17. táblázat Vancomycin mérsékeltlen érzékeny és rezisztens *Enterococcus spp*-k vancomycin MIC értékeinek megoszlása a 2003. évi bakteriológiai surveillance adatai alapján az izoláló laboratóriumok szerint

Izoláló laboratórium	Baktérium	Mért vancomycin MIC érték					Σ
		6	8	12	32	>256	
BAZ megyei ÁNTSZ	<i>Enterococcus sp.</i>	1	1	2			4
	<i>E. casseliflavus</i>	1	1				2
	<i>E. faecalis</i>	1					1
	<i>E. gallinarum</i>		1	1			2
Pest megyei ÁNTSZ	<i>E. gallinarum</i>	1					1
Sz. Sz.B. megyei ÁNTSZ	<i>E. faecalis</i>		3				3
Szekszárd Megyei Kórház	<i>E. faecalis</i>				7		7
Szt.László Kórház	<i>Enterococcus sp.</i>			1		1	2
	<i>E. faecium</i>					1	1
összesen		4	6	4	7	2	23

18. táblázat *Enterococcus spp.* vancomycin MIC eredményei a 2003. évi bakteriológiai surveillance alapján speciesek szerinti bontásban

Baktérium	érzékeny	mérséklet	rezisztens	összesen
<i>Enterococcus sp.</i>	19	5	1	25
<i>E. casseliflavus</i>	1	2		3
<i>E. faecalis</i>	102	4	7	113
<i>E. faecium</i>	11		1	12
<i>E. gallinarum</i>	2	3		5
összesen	135	14	9	158

A két táblázat adatai szerint 23 enterococcus törzs MIC értéke volt a nem érzékeny tartományban, 9-t találtak rezisztensnek és 14-t mérsékeltnek, a többi vizsgált törzs az érzé-

keny kategóriába került. Ahogy látható a mérsékeltlen érzékenyek közül 5 bizonyult VanC típusú *E. casseliflavus* vagy *E. gallinarum*-nak, ezek közül a 4 BAZ Megyei ÁNTSZ-ből származó törzs megerősítésre került. A Szent László Kórházból érkezett mérsékelt érzékenységű törzs egy haemokulturából származott és *vanBgént* hordozó *E. faecium*-nak bizonyult, s egy haematológiai osztályon kialakult halmozott előfordulás egyik izolátuma volt, s nagyon valószínű, hogy ide tartozott az a >256 µg/ml MIC értékű, teicoplaninra érzékeny *E. faecium*, s az ugyanilyen MIC értékű, de teicoplaninra nem vizsgált *Enterococcus sp.* is, amelyeket ugyanezen osztályról származó sebváladékokból izoláltak.

Vancomycin rezisztencia esetén vizsgálható az izolátum erythromycin, tetracyclin, rifampin érzékenysége, de jelentősége a terápiában inkább az újabb szerek közül a linezolidnak és a *E. faecium* okozta infekciókban quinupristin/dalfopristin-nek van.

A VanA és VanB típusú rezisztencia világszerte gyakrabban fordul elő az *E. faecium* törzsekben, s sokkal ritkábban az *E. faecalis*-ban, így nagyon gyakran fordulnak elő β-laktámokkal és aminoglikozidokkal szemben is rezisztens VRE törzsek. A VanC-típusú izolátumoknál az ampicillin rezisztencia és glikopeptid HLR rikán tapasztalható.

Irodalom:

1. **R.R.Faclam and M.D.Collins.** 1989. Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Human Infections by a Conventional Test Scheme. J Clin Microbiology, Apr. 1989. p. 731-734, Vol. 27. No. 4.
2. **Albert Manero and Anicet R. Blanch.** Identification of *Enterococcus spp.* with a Biochemical Key. Applied and Environmental Microbiology, October 1999, p. 4425-4430, Vol. 65, No.10.
3. **Shabnam Qamer, Jonathan A. T. Sandoe, and Kevin G. Kerr.** Use of Colony Morphology To Distinguish Different *Enterococcal* Strains and Species in Mixed Culture from Clinical Specimens. J. Clin Microbiol, June 2003, p.2644-2646, Vol. 41, No. 6.
4. **L.A.Devriese, M. Vancanneyt, P. Descheemaeker, M. Baele, H.W. Van Landuyt, B. Gordts, P. Butaye, J. Swings and F. Haesebrouck:** Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. Journal of Applied Microbiology, May 2002,

Összeállította: Gacs Mária, Libisch Balázs, Tirczka Tamás, Végh Zsolt, Füzi Miklós

A vancomycin rezisztens enterococcus (VRE) molekuláris vizsgálata és első járványos előfordulása Magyarországon

A vancomycin rezisztens enterococcusról a vancomycin bevezetését mintegy 30 évvel követően, a 80-as évek végén jelentek meg az első közlemények. A 90-es évek közepén az USA-ban és Európában már jelentős járványokat írtak le, amelyeket az egyre nagyobb számban izolált VRE okozott. Ezek a járványok leginkább intenzív, haematológiai, onkológiai, transplantációs osztályokon fordultak elő, ahol a betegek magas százalékban colonizáltak voltak VRE törzsekkel. A VRE leggyakrabban haemokulturából, vénakanülből katéterekből, vizeletből, székletből, a betegek bőréről, a személyzet kezéről, ruházatáról, s a környezetben előforduló tárgyakról volt kitenyészhető. Predisponáló tényezők voltak a megelőző antibiotikum kezelés vancomycinnel, cefalosporinokkal, anaerob baktériumokra ható szerekkel, és a hosszú idejű kórházi ápolás.

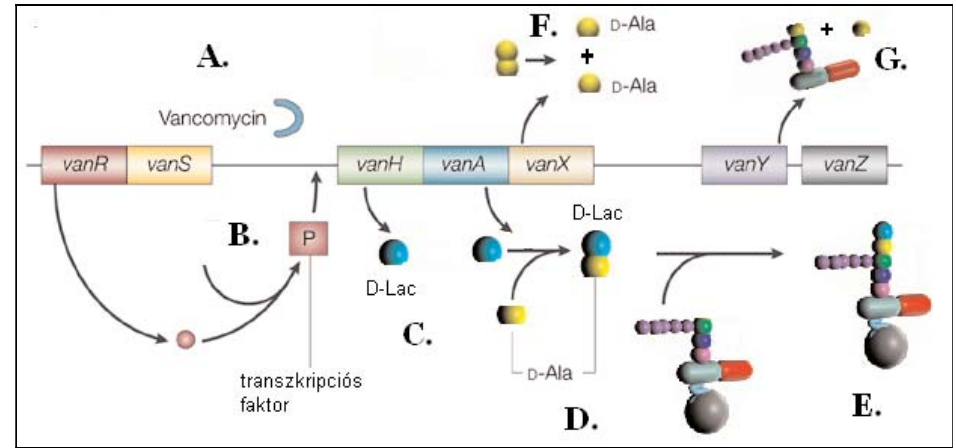
A VRE epidemiológiáját vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy más eredetű a VRE megjelenése és elterjedése az USA-ban és más Európában. Míg az USA-ban a nagymértékű antibiotikum fogyasztás játszik ebben szerepet, Európában az avoparcin (glikopeptid, mint hozamfokozó) állati takarmányba keverése következményeként jelent meg az állatok, majd az ember béltraktusában. (Az avoparcint Magyarországon is használták, talán nem olyan széleskörűen, mint máshol, de ma már mindenhol betiltották.)

Az enterococcusok vancomycin rezisztenciájáért felelős *vanA-vanC* operonok (gén csoportok) legfontosabb jellemzőit a Mikrobiológiai Körlevél ugyanezen számában az enterococcusok surveillance adatait elemző összeállításunk 15. táblázatában hasonlítottuk össze. A *vanA-vanC* operonokon levő gének együttesen, egymást kiegészítve hozzák létre a vancomycin rezisztens fenotípust. Ezek közül az operonon elhelyezkedő *vanA*, *vanB* illetve *vanC* ligáz géneket mutatjuk ki a molekuláris (PCR) vizsgálatokkal.



1. ábra *vanA* és *vanB* gének kimutatása PCR-el.

A *vanA* operon vázlatos struktúráját a 2. ábra mutatja. A *vanB* operon hasonló funkciójú géneket hordoz, de ezek sorrendje és indukálhatósága különbözik a *vanA* operontól. A rezisztencia kialakulásának alapelve a sejtfal felépítésében résztvevő módosult peptidoglikán monomerek szintézise, melyekhez kisebb affinitással kötődik a vancomycin. Az eredeti monomereket pedig a *vanA* illetve *vanB* operon által kódolt dipeptidáz és karboxipeptidáz enzimek lebontják.



2. ábra A *vanA* operon működése. **A-B:** a *vanS* vancomycin szenzor fehérje vancomycin hatására foszforilálja a *vanR* gén által kódolt transzkripció faktor, mely indukálja a *vanH-vanX* gének expresszióját **C:** *vanH* dehydrogenáz enzim D-laktátot szintetizál piroszölősavból. **D:** *vanA* ligáz D-laktát-D-alanin dipeptideket hoz létre, melyek a módosult monomerek (**E**) szintézisében vesznek részt. **F:** *vanX* dipeptidáz az eredeti monomerek szintéziséhez szükséges D-alanin-D-alanin dipeptideket bontja. **G:** *vanY* karboxipeptidáz enzim az eredeti monomereket hasítja.

A VRE izolálás során kiemelt jelentőségű enterococcus speciesek néhány fontosabb fenotípusos tulajdonságát és a hordozott vancomycin rezisztencia gének típusait az 1. táblázat foglalja össze:

1. táblázat Fontosabb fenotípusos sajátosságok és géntípusok.

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>
mannitol	+	+	+	+
szorbóz	-	-	-	-
arginin	+	+	+	+
arabinóz	-	+	+	+
mozgás	-	-	+	+
pigment	-	-	+	-
<i>van</i> gének	A, B szerzett	A, B szerzett	C ₂ természetes	C ₁ természetes

A VRE a megelőző években csak szórványosan fordult elő Magyarországon. Az első hazai PCR technikával igazolt esetet Ghidán Á. és mtsai közölték 2000-ben. Knausz M. és mtsai 2003-ban PCR vizsgálattal bizonyított ugyancsak *vanA* gént hordozó *E. faecalis* izolálásáról számoltak be egy klinikai eset kapcsán. Fenotípusos vizsgálatok alapján Füzi és mtsai számoltak be hazai előfordulásáról szűrővizsgálatokat végezve. Haematológiai osztályon vizeletben és székletben való kolonizációjáról Konkoly Thege Mariann a 2002. évi Mikrobiológiai kongresszuson számolt be.

Az OEK évi statisztikai adatai, illetve a bakteriológiai surveillance alapján a laboratóriumok csak néhány izolált törzset jelentettek, de ezek közül is csak egyesek kerültek beküldésre és megerősítésre.

Laboratóriumunk 2004-től végzi a VRE törzsek molekuláris vizsgálatát. 2002-ben 2 haemokultúrából izolált Pest és Nógrád megyéből beküldött *vanA*-gént hordozó *Enterococcus faecalis*-t, s egy mellkaspunktumból (Zala megye) származó *vanB* gén pozitív *Enterococcus faecium*-ot igazolt. A Szent László Kórház mikrobiológiai laboratóriumában, 2003-ban egy haemokultúrából, két sebváladékból, vizeletből és székletből izoláltak vancomycin nem érzékeny *Enterococcus spp*-t. Ezek közül a haemokultúrából származó izolátum az OEK Bakteriológia I. osztályán, és a Fág és molekuláris tipizáló osztályon 2004-ben elvégzett PCR és PFGE vizsgálatok alapján *vanB*-gént hordozó *E. faecium*-nak bizonyult, s az első vizsgált törzse volt annak a halmozódásnak, amely egy haematológiai osztályon alakult ki, s 2004-ben további 5 – két-két esetben, időben összefüggő – haemokultúra pozitívítást eredményezett.

A 2004 szeptemberében a haematológia osztályon végzett járványügyi vizsgálatok során a környezetben vett mintákból (vesetál, lepedő egy kórteremből, mosdótál az ágytálmósóból) *vanB* gént hordozó *E. faecium*-t sikerült izolálni, a 3 minta közül egyből (mosdótál) *E. casseliflavus* is, s egy másik mintából (széktámla) *E. gallinarum* tenyésztett ki. A betegetől származó 40 székletből 8 esetben volt kitenyészhető a *vanB* gént hordozó *E. faecium* (20%). Hat beteg hordozott *vanC* gént pozitív (15%) *Enterococcus spp*-t. Az izolátumok közül kiválasztott néhány *vanB* pozitív *E. faecium* törzs egyes antibiotikumokkal szembeni MIC értékeit a következő táblázat mutatja.

2. táblázat *VanB* gén pozitív *E. faecium* törzsek MIC értékei

törzs	E310 vér	E315 vér	22501 vizelet	23450 széklet	23453 széklet	23687 széklet	K17 környezet
ampicillin	128	128	192	256	128	192	192
penicillin	256	256	256	256	256	256	256
vancomycin	128	48	48	64	48	256	64
teicoplanin	2	1	1	2	2	2	1,5
rifampin	32	8	64	16	16	16	16
ciprofloxacin	32	32	32	32	32	32	32
linezolid	0,5	1	1	1	2	2	1
quinopristin /dalfopristin	0,5	1	1	1	1	2	1
erythromycin	4	256	256	256	4	6	256
gentamicin (HLAR)	512	256	256	256	256	256	256
streptomycin (HLAR)	256	192	>1024	>1024	256	256	>1024

Vastag számmal jelöltük a nem-érzékeny tartományba tartozó MIC értékeket.

A személyzet széklet szűrésekor egy enterococcus *vanA* gént hordozó *E. faecium*-nak bizonyult (ez a személy nem volt kapcsolatban a haematológiai osztállyal). 13 dolgozó székletéből *vanC* gén pozitív *E. gallinarum* (21%), és 5-ből (8,3%) *E. casseliflavus/E.*

flavescens tenyésztett ki. A járvány során összesen 6 beteg haemokultúrájából, 1 beteg vizeletéből, 8 beteg székletéből, s 3 környezeti mintából származó enterococcus bizonyult PCR vizsgálattal *vanB* gén-t hordozó *Enterococcus faecium*-nak.

A kromoszomális DNS makrorestrikciós vizsgálata, a PFGE a haematológiai osztályról származó törzsek azonos mintázatát mutatta, s ezek különböztek az ország más területén (Zalaegerszeg) kitenyészített *vanB* gén pozitív *Enterococcus faecium*, s az ugyanezen osztályon izolált vancomycin érzékeny törzsek mintázatától. Ez utóbbi vizsgálatok a Fág- és Molekuláris Tipizáló osztályon történtek, s a járvány monoklonális eredetét igazolták.

Az első hazai VRE járvány tanulságai és a mikrobiológiai laboratóriumok teendői:

– A haematológiai osztályon izolált törzsek PFGE profilja azonosságot mutat, eszerint a járvány monoklonális, egy VRE törzsből alakult ki. Így feltételezhető, hogy a VRE még nem endémiás az intézetben, tehát hatékony kórházhigiénés intézkedésekkel a kolonizáció és infekciók megjelenése visszaszorítható.

– A VanB *E. faecium* mellett az osztályon a VanC *E. casseliflavus* és *E. gallinarum* is jelen van. A vizsgálatok során kitenyészthető volt a betegek székletéből, a környezeti tárgyakról és összesen 29,3%-ban a személyzet székletéből. Ilyen magas %-ban való előfordulásról nem találtunk adatokat az irodalomban.

Az *E. faecium* okozta infekciók esetében a különböző rezisztencia mechanizmusok kombinálódása miatt, ahogy a járvány során izolált törzsek érzékenységi vizsgálatának eredményei is mutatják, alig van olyan antibiotikum, amelyre a kórokozó érzékeny maradt. A linezolid bevezetésével egy hatékony antibiotikum áll jelenleg rendelkezésre a VRE infekciók terápiajában. A vancomycin rezisztens enterococcus okozta infekciókban a quinupristin/dalfopristin eredményesen használható még, de csak az *E. faecium* okozta infekciókban. A linezolid és quinupristin/dalfopristin érzékenység vizsgálatát a hazai laboratóriumokban is indokolt szélesebb körben végezni.

– A VRE kolonizáció magas lehet a kórokozó szempontjából frekvenciált osztályokon, ehhez viszonyítva az infekciók száma alacsony, 10:1 arány valószínűsíthető. Gyakran nem könnyű megítélni, hogy a súlyos általános állapotú, lázas beteg esetében infekcióról vagy kolonizációról van-e szó.

Egy beteg esetében okozott egyértelműen súlyos infekciót a haemokultúrából ismételt kitenyészthető vancomycin rezisztens *E. faecium*. A beteg linezolid terápiaira gyógyult.

– A VRE Magyarországon is jelen van. Elsősorban, súlyos állapotú, huzamos ideig vagy ismételt ápolat, immunhiányos betegeket ellátó, intenzív vancomycin, cefalosporin terápiát alkalmazó, kórházi osztályokon várható a VRE kolonizáció és infekció kialakulása.

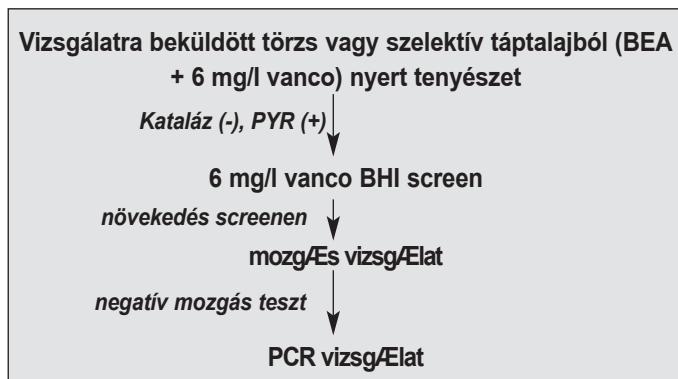
– A VRE szempontjából leginkább kritikus osztályokon (ITO, haematológia és onkológia) javasolható az újonnan felvételre kerülők perianális tampon vagy széklet szűrése. Ennek célja a kolonizált személyek elkülönítésével a rezisztencia gének átviteli lehetőségének csökkentése.

– A VRE fenotiposos identifikálását széleskörűvé kell tenni.

A rutin vizsgálatokban a VRE diagnosztikának mindkét lényeges eleme, az enterococcusok species szintű meghatározása, s a rezisztencia típusának megállapítása számos problémát vet fel. Az identifikálás első lépésében a genus szintű meghatározásban is lehetnek már nehézségek. A szokásosan elvégzett kataláz-próba, s az enterococcus agaron való növekedés mellett feltétlenül indokolt a pirrolidonil- arilamiláz (PYR) vizsgálat, segíthet a mikroszkópos morfológia vizsgálata, s a D antigén kimutatása is. A hagyományos identifikálási eljárások csak többféle, s többnapos inkubálást kívánó reakciókkal megbízhatók, de a kereskedelmi kitékkel való vizsgálatok eredményei is gyakran félrevezetőek lehetnek. A korrekt species szintű meghatározás csak molekuláris módszerekkel lehetséges. A VRE szempontjából azonban lényeges, hogy elkülönítsük a két leggyakoribb speciést, az *E. faecalis*-t, és *E. faecium*-ot egymástól és az *E. casseliflavus/flavescens*, és *E. gallinarum* speciésektől.

A VRE törzsek meghatározásának menete az OEK Bakteriológia I. osztályán jelenleg a következő fő lépések alapján történik: 6 µg/ml vancomycin tartalmú BHI agarra, mint screen lemezre való leoltás, a screen lemezen nőtt telepeket kiszélesztve, kataláz, PYR, mozgás és vancomycin, teicoplanin MIC vizsgálat. (E teszt BHI táptalajon 2 McFarland szuszpenzióval) Ezt követően PCR vizsgálat az *Enterococcus* species szintű meghatározására és a van rezisztencia típusának meghatározására.

A VRE identifikálásának menete látható az alábbi 3. ábrán:



3. ábra

- VRE megjelenésekor a környezetben átfogó szűrővizsgálatok szükségesek a betegek és személyzet körében, kiegészítve a környezeti tárgyakról vett minták vizsgálatával. A széklet szűrővizsgálatokhoz ajánlott a 6 µg/ml vancomycint, epét, eszkulint és Nazidot tartalmazó szelektív táptalaj (BEA) használata. Vancomycin szelektív agar VCA BioMerieux VCA3.
- a VRE fenotipusos vizsgálatát meg kell erősíteni molekuláris vizsgálatokkal. A VRE gyanús törzseket az OEK Bakteriológia I osztályra kell küldeni,

Összeállította: Libisch Balázs, Gacs Mária, Tirczka Tamás, Glatz Katalin
OEK Bakteriológiai Főosztály

Irodalom:

1. Leclercq R., Derlot E., Duval J., Courvalin P. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 319:157-161
2. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988 Jan 2-9;1(8575-6):57-8.
3. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000 Oct;13(4):686-707
4. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol. 1995 Jan; 33 (1):24-7. Erratum in: J Clin Microbiol 1995 May; 33(5):1434.

5. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje J.A, Meis JF, Voss A; European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 Nov; 19 (11): 816-22.
6. Ghidán, Á., Jeney, Cs., Maródi, Cs.L., Csiszár, K., Rozgonyi, F. 2000. PCR detection of the *vanA* gene in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Hungary. J. Antimicrob Chemother, 46, 325
7. Knausz, M., B. Gartner, I. Fömötör, Á. Ghidán, K. Kamotsay and F. Rozgonyi: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization during recovery from *Neisseria meningitidis* cerebrospinal meningitis. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 50 (4), pp. 453-457 (2003)
8. Ifj. Füzi M., Tóth, K., Lajos, Z., Jung, J.-né, Nagy, A., Zsolnai, B., Pados, Gy., Rényi, I., Benyó, G., Kovács, J., Székely, E., Sipos, E.: Vancomycin-rezisztens enterococcus törzsek izolálása Magyarországon; Infektológia és klinikai mikrobiológia 1998.5.évf.3.szám
9. Brown, D. F., and E. Walpole. 2003. Evaluation of selective and enrichment media for isolation of glycopeptid resistant enterococci from faecal specimens. J. Antimicrob. Chemother. 51: 289-296.
10. Novicki, T. J., Schapiro, J. M., Ulness, B. J., Sebeste, A., Busse- Johnston, L., Swanson, K. M., Swanzy, S. R., Leisenring W., and Limaye A. P. 2004. Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus* from fecal material. J. Clin. Microbiol. 42: 1637-1640
11. Taylor, M. E., B. A. Oppenheim, P. R. Chadwick, D. Weston, M. F. Palepou, N. Woodford, and M. Bellis. 1999. Detection of glycopeptid resistant enterococci in routine diagnostic faeces specimens. J. Hosp Infect 43: 25-32.

A 2003. évi OEK bakteriológiai surveillance adatok elemzése 3. rész

Escherichia coli* és *Klebsiella spp.

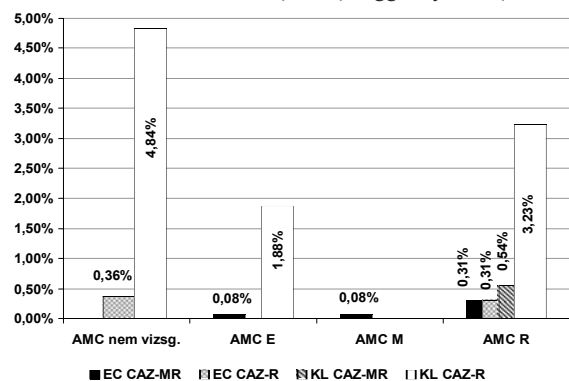
Már az előző körlevelekben is foglalkoztunk azokkal az *E. coli* és *Klebsiella spp.* törzsekkel, amelyek a 3. generációs cefalosporinokkal szemben rezisztenciát mutattak.

Jelentőségükre úgy gondoljuk, nem kell külön felhívni a figyelmet. Az invazív fertőzésekből izolált 3. gen. cefalosporinra rezisztens *E. coli* törzsek számának változását Magyarországon az EARSS adatai alapján a **1. táblázat**ban tüntettük fel. Az EARSS a *Klebsiella spp.*-k hasonló rezisztenciájával nem foglalkozik, annak ellenére, hogy az eddig meg erősítésre beérkezett törzsek között ESBL termelő *Klebsiella spp* több van, mint *E. coli*.

1. táblázat Invazív fertőzésekből izolált *Escherichia coli* 3. gen. cefalosporinokkal szembeni érzékenysége Magyarországon az EARSS adatai szerint 2001–2003. években

év	darabszám				százalék		
	érzékeny	mérsékelt	rezisztens	összes	érzékeny	mérsékelt	rezisztens
2001	257	4	1	262	98,1	1,5	0,4
2002	341	2	7	350	97,4	0,6	2,0
2003	827	6	8	841	98,3	0,7	1,0

Invazív mintákból izolált *E. coli* (n= 1275) és *Klebsiella spp.* (n= 372) ceftazidim (CAZ) érzékenysége az amoxicillin/klavulánsav (AMC) függvényében (2003.év surveillance)



1. ábra

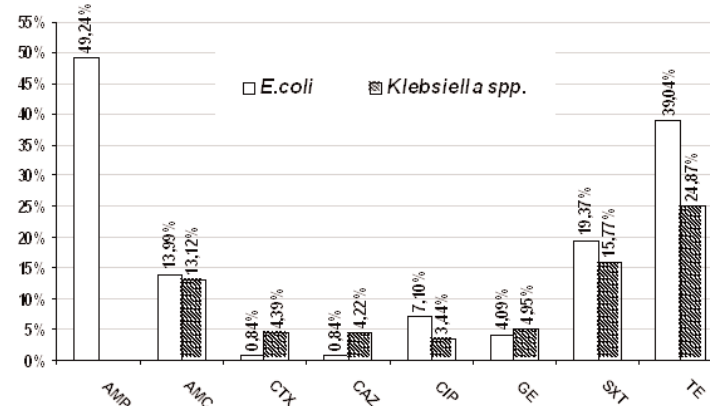
A *Klebsiella ssp.* és *Escherichia coli* 3. generációs cefalosporin rezisztenciáját leggyakrabban ESBL gén termelése okozza. Ennek felismerésére a ceftazidim (CAZ) „nem-érzékenységet” indikátorként használtuk, melyet a 1. ábra oszlop diagrammján az amoxicillin / klavulánsav (AMC) érzékenység függvényében ábrázoltunk.

A diagram adataiból jól látható, hogy a CAZ nem-érzékeny törzsek jó részét nem vizsgálták meg a β -laktám/ β -laktamáz inhibitor kombinációval (AMC). Az AMC rezisztencia kérdésével már 3. évf/ 4. számú körlevélben is foglalkoztunk. A CAZ nem-érzékeny törzsek függvényében vizsgálva a kérdést láthatjuk, hogy a klebsiellák körében másfélszer annyi, míg *E. coli* körében ötször annyi AMC nem-érzékeny izolátum van, mint-érzékeny. Az ESBL referencia laborba beküldött törzseknél is egyre gyakrabban tapasztalunk AMC rezisztenciát, de a surveillance-ban megtalálható arányt, tapasztalataink alapján, még nem értük el, ezért ezeknek az antibiotikumoknak (AMC, ampicillin-sulbactam, piperacillin-tazobactam (!)) körültekintő vizsgálatára, és az azonosításra most is szeretnénk felhívni a figyelmet.

Az invazív mintákból származó CAZ nem-érzékeny *E. coli* törzsek aránya alacsony (1,02%), míg a *Klebsiella spp.*-nél ezek előfordulása jóval magasabb (9,95%).

Az adatok alapján 8 esetben (7 *E. coli* és 1 *Klebsiella spp.*) fordult elő, hogy cefotaximra nem-érzékeny törzset ceftazidimre-érzékenynek adtak ki. Ilyen *in vitro* érzékenységnél felmerül az ESBL termelés lehetősége. Amennyiben az ESBL termelés igazolódott,

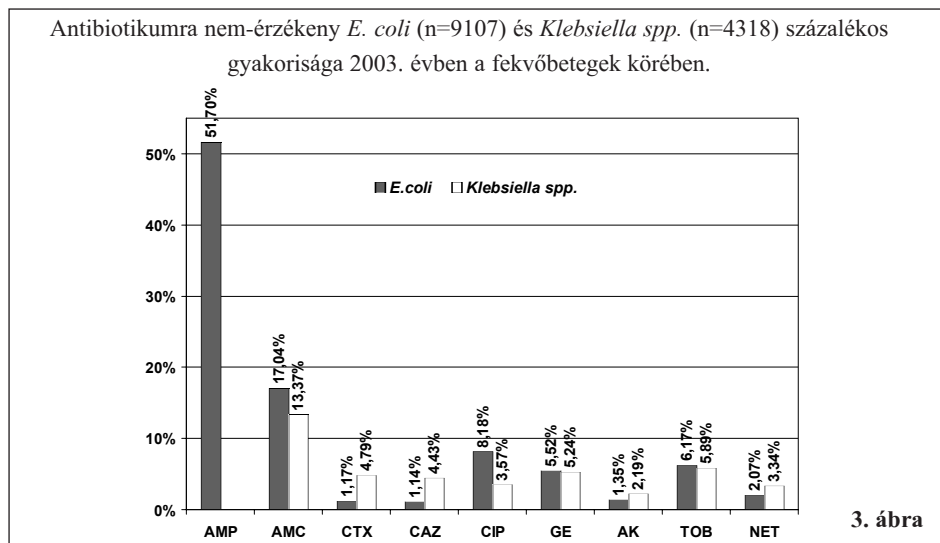
Antibiotikumra nem-érzékeny *E. coli* (n=20001) és *Klebsiella spp.* (n=7610) százalékos gyakorisága 2003. évben a surveillance adatok alapján.



2. ábra

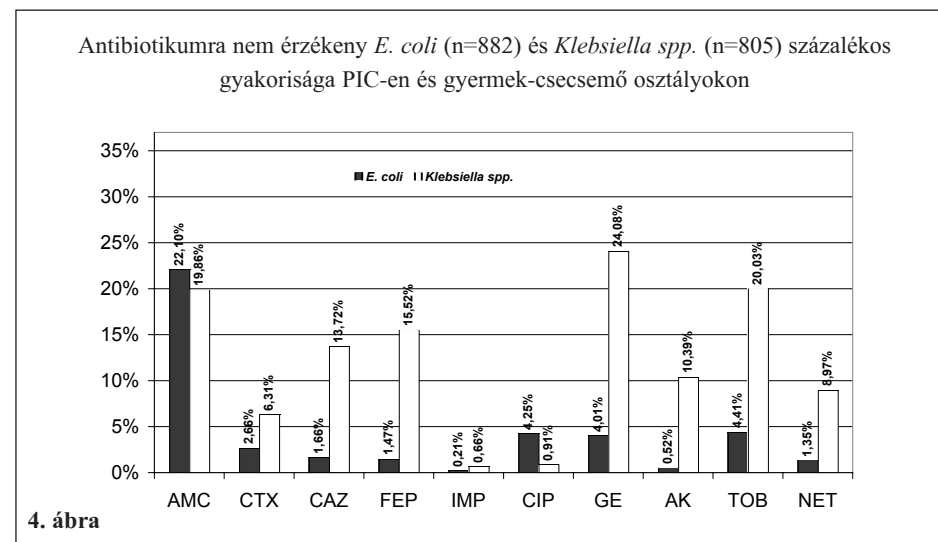
akkor minden 3. gen. cefalosporinra rezisztens eredményt kellett volna kiadni. (Megjegyzés: ezeket a törzseket kérjük, küldjék be referencia laboratóriumba megerősítésre.)

A 2. ábrán a vizsgált időszakban izolált összes *E. coli* és *Klebsiella spp.* tisztított adata látható. Az *E. coli*-ban és *Klebsiella spp.*-ben előforduló 15 %-os AMC rezisztencia itt is szembeűnő, és ez a későbbi két ábrán magas százalékot ér el. A 3. gen. cefalosporinokkal szembeni rezisztencia és mérsékelt érzékenység hasonló arányokat mutat a két csoport között, mint az invazív mintáknál. Ez a különbség nemcsak százalékosan, hanem számszerűen is jelentkezik: 2003. évben 2,5- 3-szor több ceftazidim/ cefotaxim nem-érzékeny *Klebsiella spp.*-t izoláltak, mint *E. coli*-t. A cotrimoxazol (SXT) nem érzékenyek aránya közel jár mindkét csoportban a 20%-hoz, míg a tetracyclinnél ezt meg is haladja. Ezeknek az antibiotikumoknak főleg a járóbeteg ellátásban van szerepük; a 2003-as adatok alapján empirikus alkalmazásuk megfontolandó.



A 3. ábrán a fekvőbetegek körében izolált *E. coli* és *Klebsiella spp.*-k adatait tüntettük fel. Kiemelt figyelmet fordítottunk a 3. generációs cefalosporinok mellett az aminoglikozidokra. Mint látható ezekre – a ciprofloxacinnal együtt – a törzsek több, mint 90%-a érzékeny. A cefalosporinokra inkább a klebsiellák, míg a ciprofloxacinnal inkább az *E. coli*

nem érzékeny. Az aminoglikozid rezisztencia hasonló mintázatot mutat a két csoportnál.



A fekvőbetegeken belül tovább szűkítettük a kört az újszülött és a csecsemő osztályokra, ahol világszerte a legnagyobb arányban fordulnak elő az ESBL-termelő kórokozók. A 4. ábrán látható adatokat statisztikai próbákkal is elemeztük.

Az *E. coli* esetében nem lehetett megbízhatóan elvégezni ezeket a statisztikai számításokat, mert kevés esetben volt minden antibiotikum együtt vizsgálva (csak 254 esetben vizsgálták az ábrán felsorolt összes antibiotikumot a tisztítás során kapott 882 esetből). Az oszlopdiaagramból azonban jól látható, hogy az AMC kivételével, az izolátumoknak több mint 95%-a érzékeny az összes vizsgált antibiotikumra. A cefotaxim nem-érzékenység látványosan magasabb, mint a ceftazidimnél, de ez valószínűleg két főbb okra vezethető vissza: (i) az ESBL referencia labor adatai alapján egyre több CTX-M típusú ESBL-termelő *E. coli*-t izolálnak, melyek in vitro ceftazidim érzékenyeknek mutatkoznak, azonban, ahogy fentebb már említettük, ezeket minden 3. generációs cefalosporinra rezisztensnek kell interpretálni; (ii) számos izolátumnál nem vizsgálták a cefotaximot és ez torzította a százalékos arányokat.

A klebsiellák 19,86%-a volt nem érzékeny az AMC-ra. Az adatok további vizsgálata azt mutatta, hogy ezeknek az izolátumoknak csak mintegy harmada került ki a ceftazidim nem érzékenyek közül, míg a többi egyébként érzékeny törzsekben fordult elő. Ez a fenotípus nem gyakori az irodalom szerint (mivel jórészt mutációval alakul ki), ezért itt is meg kell említeni a helyes és körültekintő vizsgálatok fontosságát. A cefotaxim érzékenységi adatok a fentebb említett (ii) ok miatt torzítanak, ezért a leggyakrabban vizsgált 3. gen. cefalosporin, a ceftazidim (CAZ) alapján elemeztük tovább az eredményeket.

A PIC-en és gyerekosztályokon izolált klebsiellák 13,72 %-os CAZ rezisztenciája abba az irányba mutat, hogy a közeljövőben már nem ajánlható ezeken az osztályokon elsődlegesen választható empirikus szerként. A cefepim kiugróan magas értéke a 4. ábrán csak tájékoztató jellegű, mivel kb. az esetek 70%-ban nem vizsgálták ezt az antibiotikumot. 9 esetben volt CAZ nem érzékeny eredmény mellett cefepim érzékenység közölve. Minden esetben AMC-ra is rezisztensek voltak. Ha az ESBL-termelés megerősítése megtörtént, és az eredmény pozitív volt, ajánlott rezisztensnek kiadni a cefepimet is. Ha a vizsgálat negatívnak bizonyult, akkor gondolni kell az utóbbi időkben egyre nagyobb teret hódító, plazmidon kódolt, konstitutív termelődő AmpC típusú β -laktamázok jelenlétére, melyek szintén 3. gen. cefalosporinokkal szembeni rezisztenciát biztosít.

Az imipenem és a ciprofloxacín tünik in vitro a leghatékonyabbnak ezekkel az izolátumokkal szemben. Mindkettő érzékenységi aránya 95% felett van mindkét csoportban. Az aminoglikozid rezisztencia jellegzetes mintázatot mutat, ami már a 3. ábrán is megfigyelhető, és ennek valóságát a statisztikai próba is megerősítette. A gentamicin és a tobramycin együttes rezisztenciája fordult elő leggyakrabban, az esetek felében a rezisztencia mind a négy vizsgált aminoglikozidra kiterjedt. Előbbi kettő nem- érzékenysége elérte a 20%-ot, amely miatt már jelenleg sem ajánlhatóak az empirikus kezelésben. A ceftazidim rezisztencia és az aminoglikozid rezisztencia között is egyértelmű, szignifikáns összefüggés van (a netilmicint nem tudtuk értékelni, mivel csak 408 esetben vizsgálták). Ez arra enged következtetni (amit az osztályunkon végzett vizsgálatok is megerősítenek), hogy ESBL-járvány esetén az aminoglikozidok, mint alternatíván választható szerek, használhatósága jelentősen csökken.

ESBL termelő Klebsiella pneumoniae és K. oxytoca járványtörzsek molekuláris-epidemiológiai tipizálása

Az ESBL termelő klebsiella fajok világszerte a leggyakrabban izolált multirezisztens Gram-negatív baktériumok közé tartoznak (1). Súlyos fertőzéseket, kiterjedt járványokat főleg a koraszülött-újszülött, valamint az intenzív osztályokon okoznak (2).

Magyarországon 2002 óta folyik az ESBL termelés fenotípusos és genetikai rutin vizsgálata az OEK Bakteriológia I-s Osztályán, ahogy arról már beszámoltunk a 2évf./2. és a 4. évf/1 számú körlevélben. Az OEK-ben ESBL termelés megerősítésére beküldött évenkénti 150-200 *Klebsiella spp.* törzs döntő többsége kórházi mintákból származik, leggyakrabban gyermek, perinatalis intenzív és intenzív osztályokból. A helyzet rendkívül aggasztó, gyakoriak a sok beteget érintő, évenként visszatérő, nehezen felszámolható járványok.

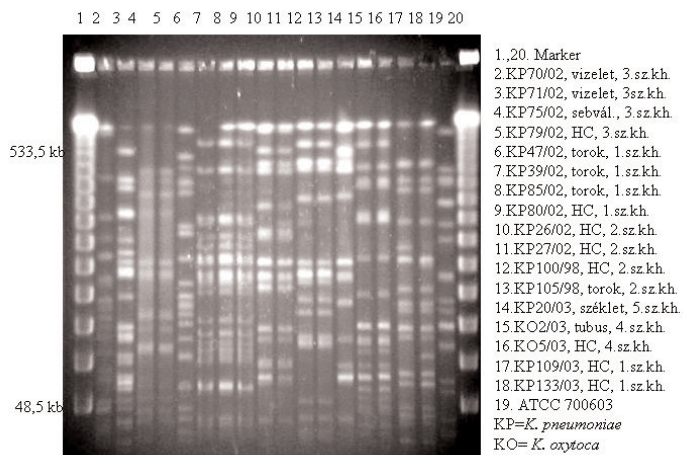
A multirezisztens ESBL termelő klebsiellák terjedése csak kellően megalapozott, gyors járványügyi intézkedésekkel állítható meg. Ehhez viszont szükség van széleskörű epidemiológiai vizsgálatokra, több klasszikus és molekuláris módszer együttes alkalmazására.

A fágtypizálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztályon, valamint a Bakteriológia I Osztályon 134 *K. pneumoniae* és 10 *K. oxytoca* ESBL termelő törzs komplex epidemiológiai tipizálását végeztük el. A törzsek négy bejelentett járványból és több halmozódásból származtak. 2002-2003-as időszakban izolálták őket koraszülött, újszülött, valamint gyermekosztályokon az ország 5 megyei és egyetemi kórházában (1. táblázat). Az ESBL termelést kétkorong diffúziós teszttel, ESBL E-teszttel PCR-rel és SHV-RFLP módszerekkel igazoltuk. A törzsek epidemiológiai tipizálását további négy módszer eredményeinek összehasonlításával végeztük el: fágtypizálás, plazmid profil meghatározás, ERIC-PCR és PFGE (1. táblázat).

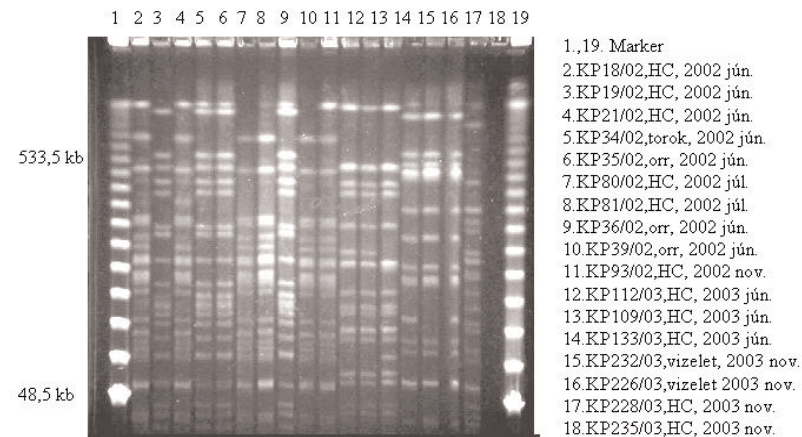
A járvány vagy halmozódás igazolása elsődlegesen fágtypizálással történt. A 144 törzs közül 115 tíz különböző fágtypusba tartozott, 29 viszont nem volt fággal tipizálható. Az egyes fágtypusok általában adott járvány törzseire voltak jellemzőek. A tipizálás következő lépése az ERIC-PCR típusok, ill. szubtypusok meghatározása volt. A vizsgálat

ERIC 2 primerrel történt és az egyes típusokat az elektroforetikus mintázat (amplifikációs termékek mérete) alapján különítettük el. A törzseket 5 típusba, azon belül pedig 8 szubtypusba soroltuk be. Eszerint volt olyan járvány, melyet két különböző ERIC-szubtypusba tartozó, de azonos fágtípusú klón okozott (1.sz. Kórház). Voltak azonban olyan járványtörzsek is, amelyeknek ERIC-szubtypusa azonos volt, de két különböző kórházban okoztak járványokat (2.sz. és 5.sz. Kórház).

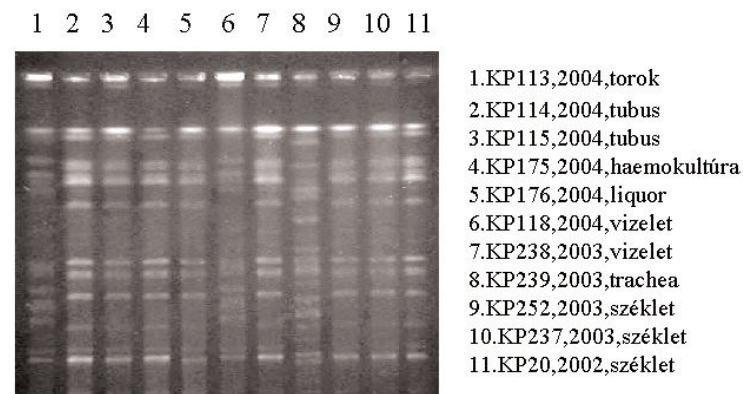
Fentiek ismeretében a járványtörzsek egyértelmű elkülönítésére a továbbiakban a PFGE módszert alkalmaztuk. A törzseket akkor tekintettük egy klónhoz tartozónak, ha a makrorestrikciós profiljuk legalább 90%-ban megegyezett. Így a 144 vizsgált törzs 13 pulstípusba volt besorolható, tehát 13 féle ESBL-termelő *Klebsiella* klón terjedését állapíthattunk meg (1. ábra). Minden egyes klont csak egy adott kórházból izolálták. Beigazolódott az, hogy az 1.sz. Kórházban 2002 júniusában lezajló járványt valóban két klón együttes terjedése okozta. Ugyanennek a járványnak a második szakaszában viszont – 2002 novemberében – csak az egyik klón vett részt. Az 1.sz. Kórházban lezajlott további két járványt pedig más-más klónok okozták (2. ábra). A 2.sz. és 5.sz. Kórházból izolált, azonos ERIC-szubtypusba besorolt járványtörzsekről bebizonyosodott, hogy két különböző klónhoz tartoznak, mivel PFGE profiljuk csak 70%-os hasonlóságot mutatott (1. ábra, KP26/02 és KP27/02 vs. KP100/98 és KP105/98).



1. ábra. Járványokból izolált ESBL termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsek PFGE mintázata.



2. ábra. Járványokból izolált ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsek PFGE mintázata, 2002-2003, 1. sz. kórház



3. ábra. ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsek PFGE mintázata, 2002-2003, 5. sz. kórház

Fontos kiemelni, hogy az 5.sz. Kórházban 2002 júniusában csak székletből izolált 8 törzs ERIC szubtypusa és PFGE típusa teljesen megegyezett az ugyanabban a kórházban másfél évvel később lezajlott járvány haemokultúrából, liquorból és vizeletből izolált törzseinek típusával (3. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy az osztályon több mint egy évig perzisztált ugyanaz az ESBL termelő klón. Tehát a multirezisztens ESBL termelő *Klebsiella* törzsekre külön figyelmet kell fordítani, még akkor is, ha csak kolonizált betegekben származnak.

Mivel a szakirodalom szerint (3) az ESBL termelésért felelős gének többnyire konjugatív plazmidon vannak kódolva, elengedhetetlennek tartottuk az általunk vizsgált törzsek plazmidprofil meghatározását. A 144 törzs több mint 20-féle plazmidprofil mutatót, törzsenként 1-6 plazmiddal. Minden törzsből kimutathatók voltak nagyméretű plazmidok (50 kb fölött). Ezenbélül 138 törzs rendelkezett egy azonos méretű 94 kb plazmiddal, melyről konjugációs kísérletekkel bizonyítottuk, hogy minden járvány klón esetében ez a plazmid hordozza az ESBL termelésért felelős géneket. Ez a mobilis genetikai elem rendkívül gyorsan terjed – fajok között is – és feltehetően aminoglikozidokkal szembeni rezisztenciát is hordoz.

Tájékoztatónk elsődleges célja a figyelemfelhívás. Bebizonyítottuk, hogy kórházi környezetben a multirezisztens ESBL termelő *Klebsiella sp.* törzsek képesek akár másfél évig fennmaradni és járványt előidézni, vagy rezisztencia plazmidjaikat fajon belül és fajok között is terjeszteni. Járványügyi szempontból nagyon fontos tehát e törzsek gyors eradikációja, főleg az intenzív osztályokon, mivel a „csak” kolonizált személyekből származó törzsek is képesek rövid időn belül nagy kiterjedésű járványokat okozni. Fontos továbbá minél több higiéniai minta gyűjtése és küldése is a fertőző forrás megállapításához.

1. táblázat. Járványokból izolált ESBL termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsek komplex molekuláris-epidemiológiai tipizálása.

Bakt.faj/Származás	Izolálás ideje	Fágtípus(n)	ERIC szubtípus(n)	Plazmid profil (kb)(n)	PFGE típus
<i>K. pneumoniae</i> 1. Kórház	06. 2002.	IIB2 (26)	7A (13)	181 94 80 (9) ^{b2}	E
				145 73 (1)	
				203 94 (2)	
				203 181 (1)	
		3B (13)	174 73 50 (1)	D	
			181 94 50 (7)		
			181 94 (4) ^{b1}		
			203 181 (1)		
			145 73 29 (1)		
			203 181 (1)		
NT (8) ^a	7A (7)	181 94 (3) ^{b2}	E		
		203 94 (3)			

Bakt.faj/Származás	Izolálás ideje	Fágtípus(n)	ERIC szubtípus(n)	Plazmid profil (kb)(n)	PFGE típus
	11. 2002	NT (6)	3B (1)	203 162 (1)	D
			7A (6)	188 50 (1)	
			7A (6)	181 94 (4) ^{b1}	
	07. 2003	IIA1 (24) IIA20 (2)	3C (24)	94 2.6 (24) ^{b3}	J
			3C (2)	94 2.6 (2)	
	10. 2003	IVA1 (20) IIIA1 (4)	11 (20)	170 94 3.3 ^{b2}	M
11 (4)			170 94 (4)		
<i>K. pneumoniae</i> 2. Kórház	07. 2002	IIIB5 (9)	14A (9)	137 94 (9) ^{b3}	F
<i>K. pneumoniae</i> 3. Kórház	11. 2002	VIIA (3) IXA4 (1)	7D (3)	162 94 (3)b2	C
			7D (1)	203 94 (1)	
	és 12. 2002	XA1 (1) NT (7)	7B1 (1)	94 50 5.4 4.3 3.7 2.3 (1)	B2
			7A1 (2)	116 18 (2)	
			7B (4)	228 94 5.5 (1)	
			7D (1)	228 94 5.5 5.2 2.9 (2)	
			94 5.5 (1)	B1	
			228 130 94 4.6 (1)	C2	
<i>K. oxytoca</i> 4. Kórház	04. 2002	IIA1 (10)	OA1 (10)	94 6.0 (10) ^{b1}	I
<i>K. pneumoniae</i> 5. Kórház	07. 2002	NT (8)	14A (8)	170 94 (1)94 (7)	H
	10. 2003	IXA1 (15)	14A (15)	170 94 (15)	H

^a: fággal nem tipizálható törzsek; ^b(n): haemokultúrából izolált törzsek száma

Irodalom

- Bradford, P.A. 2001. Clin Microbiol Rev, 14: 933-951;
- Yuan, M. et al. 1998. J Antimicrobial Chemother. 41: 527-539;
- Prodinger, W.M. et al. 1996. J Clin Microbiol. 34: 564-568

Összeállította: Dr. Damjanova Ivelina, Tóth Ákos