

**2005. 5. évfolyam 1. szám**

**Tartalom:**

„Internet-based Information System” egy új kezdeményezés az Európai Unió Antibiotikum Rezisztencia Surveillance rendszerében

Füzi Miklós dr.

Az OEK Bakteriológiai Surveillance 2004. első félévi adatainak elemzése: methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*

Gacs Mária dr., Tóth Ákos, Tirczka Tamás, Végh Zsolt dr.

A macrolid rezisztens *Staphylococcus aureus* clindamycin rezisztenciája

Tóth Ákos, Gacs Mária dr.

Dél-német MRSA klón elterjedése Magyarországon 2002-2004 között

Pásztai Judit, Ungvári Erika, Hetzmann Istvánné, Vargáné Hunyadi Zsuzsanna, Füzi Miklós

Az OEK Bakteriológiai Surveillance 2004. első félévi adatainak elemzése: a *Streptococcus pneumoniae* antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája

Gacs Mária dr., Libisch Balázs, Tirczka Tamás, Végh Zsolt dr.

A *Bordetella pertussis* fertőzés laboratóriumi diagnosztikája

Füzi Miklós dr.

Humán patogén *Plasmodium* speciesek kimutatása és azonosítása seminested-multiplex PCR módszerrel

Horváth Katalin, Szénási Zsuzsanna dr., Kucsera István dr., Todorova Roszica dr., Tárkányi Klára dr.

## **"Internet-based Information System"; egy új kezdeményezés az Európai Unió Antibiotikum Rezisztencia Surveillance rendszerében.**

Az Európai Unió Antibiotikum Surveillance /EARSS/ 2004. novemberi madridi találkozásán döntés született egy újfajta internet alapú európai mikrobiológiai információs rendszer felállításáról. Az "Internet-based Information System" /EARSS-IBIS/ a szokatlan rezisztencia típusokról, a különleges specieszbe tartozó kórokozók izolálásáról és a nemzetközi jelentőséggel bíró nosocomiális járványok előfordulásáról fog adatokat gyűjteni egy közös EARSS-IBIS honlapon keresztül. Az EARSS-ben részt vevő bármely laboratórium, amely vállalja, hogy bekapcsolódik az "IBIS" programba kezdeményezheti adatok feltüntetését az EARSS-IBIS honlapon. Az adatok megbízhatóságáért ugyanakkor nem csak az izolálást végző laboratórium, hanem a nemzeti EARSS központ /Magyarországon az OEK Bakteriológiai osztály/ is felelősséget kell vállaljon, ezért a honlapra csak olyan eredmények kerülhetnek fel, amelyeket az OEK Bakteriológiai osztálya is megerősített. Rövidesen körlevelet küldünk ki a laboratóriumok részére, amely egy nyilatkozatot fog tartalmazni az EARSS-IBIS rendszerben való részvételre vonatkozóan. Azok a laboratóriumok, amelyek a nyilatkozatot aláírva visszaküldik, vállalják, hogy különleges izolálásaikról tájékoztatják az Európai Unió szakmai közvéleményét, ugyanakkor maguk is hozzáférési lehetőséget kapnak az EARSS-IBIS honlaphoz, ahol folyamatosan figyelemmel kísérhetik a több, mint 600 EARSS laboratórium által közölt eredményeket. Reméljük, hogy a hazai mikrobiológiai laboratóriumok minél nagyobb számban fognak csatlakozni az EARSS-IBIS programhoz. Azoknak a laboratóriumoknak, amelyek csatlakoznak a rendszerhez hozzáférési lehetőséget fogunk tudni biztosítani az EARSS-IBIS honlaphoz.

*Dr. Füzi Miklós*  
*Országos Epidemiológiai Központ*

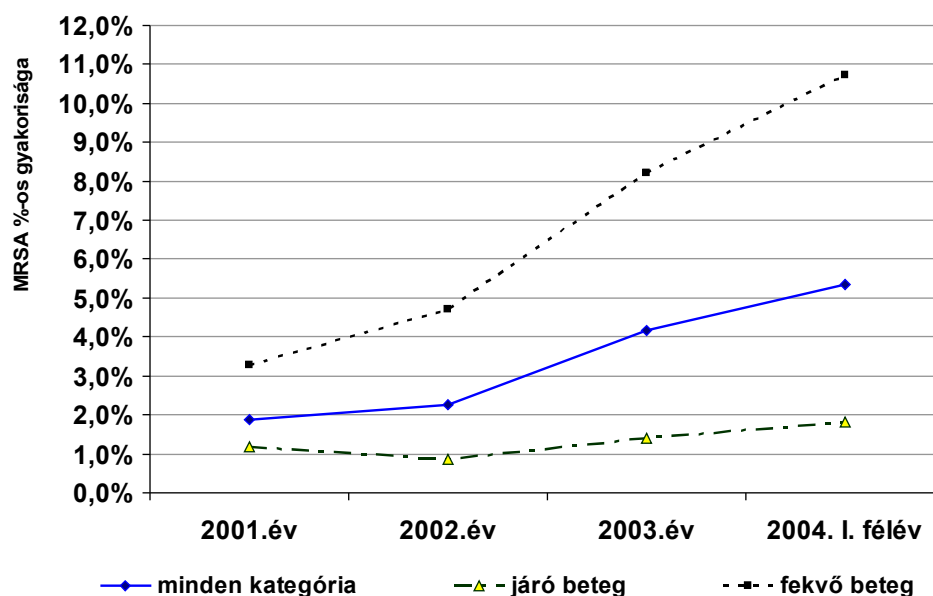
## Az OEK Bakteriológiai Surveillance 2004 első félévi adatainak elemzése: methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*

A 2004. évi surveillance eredmények közül most csak az első félévi adatok elemzésére van mód, mivel egyes laboratóriumok adatszolgáltatása késik, s így az adatállomány még mindig nem teljes. Az első félévi adatok közül csak a leglényegesebbeket emeljük ki, s az egész év értékelésére a Körlevél következő számában kerül sor.

### MRSA (methicillin rezisztens *S. aureus*)

A surveillance adatok azt mutatják, hogy az izolált MRSA törzsek száma tovább növekedett. Ha összehasonlítjuk a 2003. és 2004. első félévi surveillance eredményeket, azt találjuk, hogy az előfordulási gyakoriság összességében 4%-ról 5% fölé emelkedett és a fekvő betegek körében megközelítette a 11%-ot (1. ábra).

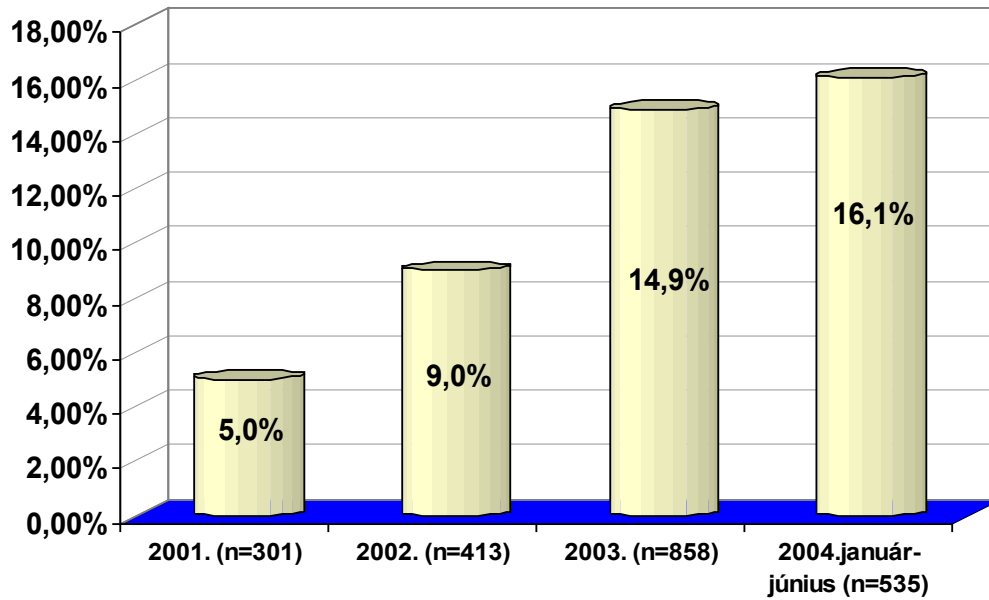
**Az MRSA előfordulási gyakorisága 2001- től 2004. június végéig  
összesen valamint járó- és fekvőbeteg szerinti bontásban  
(OEK-BS)**



1. ábra

Mint az ábrán látható az MRSA %-os aránya 2001-től folyamatosan növekedett. Ez a növekedés legkifejezettebb a fekvő betegek esetében, ahol az MRSA előfordulása 2003-as évi 8% helyett, 2004 első félévében 10,5% volt. Ez azt mutatja, hogy az MRSA terjedését Magyarországon nem sikerült megállítani. Amennyiben az invazív infekciókból származó mintákból izolált törzseket tekintjük, az MRSA %-os aránya ugyancsak magasabb. Bár a növekedés kisebb arányúnak látszik (2. ábra), végleges következtetéseket csak az egész év adatainak feldolgozása után tehetünk.

**MRSA gyakoriságának változása invazív mintákban  
2001-től 2004. első félévéig Magyarországon (OEK-  
BS adatok szerint)**



**2. ábra**

A kórokozóval kapcsolatban ebben a számban részletesebben az indukálható clindamycin rezisztenciával és a Dél-Német MRSA clon magyarországi elterjedésével foglalkozunk. (Ezek a témák az OEK 2005. március 8.-i tudományos ülésének előadásaként szerepeltek.)

## A makrolid rezisztens *Staphylococcus aureus* clindamycin rezisztenciája

A NCCLS 2004. évi kiadásának egyik újdonsága, hogy ajánlást tesz a makrolid rezisztens staphylococcusok clindamycin rezisztenciájának vizsgálatára, és az eredmények interpretálására. Jelen írásunkban a módszerről, annak háttéréről, valamint a magyarországi helyzetről szólunk néhány szót.

A makrolidok bakteriosztatikus hatású antibiotikumok, mivel irreverzibilisen képesek kötődni a riboszóma 50S alegységéhez, és így gátolni a fehérjeszintézist. A *S. aureus* makrolidokkal szembeni rezisztenciája két fő, egymástól különböző rezisztencia mechanizmus eredménye.

Az egyik, az *msr(A)* gén által kódolt ATP-függő efflux mechanizmuson alapuló rezisztencia, amely a makrolidok mellett a streptogramin B antibiotikumokkal szemben is rezisztenciát biztosít, a clindamycinre hatástalan.

A másik mechanizmus az antibiotikum célpontjának módosításán alapul. Az *erm* gének által kódolt adenin-N<sup>6</sup> metil-transzferáz a 23S rRNS-t képes metilálni a transzkripció után. Ezzel megakadályozva az előbbi két antibiotikumcsoport tagjai mellett a clindamycin kötődését is a riboszómához. Ez az MLS<sub>B</sub>-nek nevezett rezisztencia Makrolidokra, Lincosamidokra (pl. clindamycin) és B csoportú Streptograminokra (pl. quinupristin) terjed ki.

Fenotípusosan az MLS<sub>B</sub> rezisztencia megjelenhet indukálható (iMLS<sub>B</sub>) vagy konstitutív (cMLS<sub>B</sub>) formában. Ennek a mechanizmusnak a molekuláris háttérét is jól ismerjük: Az *erm(A)* és *erm(C)* esetében az *erm* génről átírt mRNS-ről antibiotikum hiányában fehérje nem fejeződik ki. Az antibiotikum megjelenése és kapcsolódása az mRNS-hez biztosítja a fehérje kifejeződését és a rezisztencia kialakulását. Ezek az iMLS<sub>B</sub> mutató törzsek A rendszert legjobban a makrolidok tudják indukálni, kevésbé a clindamycin és legkevésbé a streptograminok. Az *erm* gén szabályozó régiójában történő deléción, duplikáción, vagy más mutáción alakítja ki a konstitutív fenotípust (cMLS<sub>B</sub>), melynél a fehérje makrolid hiányában is képes kifejeződni. Az 1960-70-es években az iMLS<sub>B</sub> volt a legelterjedtebb, ma a konstitutív fenotípus a leggyakoribb.

Az *msr(A)* gén és *erm* gének együtt és más rezisztencia mechanizmusokkal kombinációban is megtalálhatók.

Az utóbbi években számos közlemény jelent meg a gének európai előfordulásáról. Úgy tűnik, Európában leginkább az *erm(A)* és *erm(C)* gének terjedtek el.

A rutin antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során fontos a különböző rezisztencia mechanizmusok felismerése. A cMLS<sub>B</sub> fenotípus könnyen felismerhető az egyidejű makrolid-clindamycin rezisztencia alapján. Az *erm* gén által kódolt cMLS<sub>B</sub> a streptograminok közül csak a B csoportúakkal szemben teszi rezisztenssé a törzseket, így a quinupristin/dalfopristin hatásos marad, azonban kombinálódva streptogramin A-ra (pl. dalfopristin) ható inaktíváló (mph(C)) vagy efflux (vga) mechanizmussal, a törzs már rezisztenssé válik synergidre is.

Az indukálható clindamycin rezisztencia (iMLS<sub>B</sub>), az *msr(A)* által kódolt efflux alapú makrolid rezisztenciához hasonlóan, erythromycin rezisztens-clindamycin érzékeny fenotípust ad (1. táblázat). Azonban míg utóbbi valódi lincosamid érzékenységet jelent, addig az iMLS<sub>B</sub> fenotípusú, érzékenynek látszó törzseknél több esetben leírtak hatástalan clindamycin terápiát. A két típus elkülönítésére használható az egyszerűen kivitelezhető és informatív „D-test”, mely alkalmazását ajánljuk minden erythromycin mérsékleten érzékeny/rezisztens és clindamycin érzékeny *S. aureus* törzs esetében.

## 1. táblázat

Mechanizmus	Kódoló gén	Erythromycin	Clindamycin
Efflux	<i>msr(A)</i>	R	É
Riboszóma módosítás, indukálható	<i>erm</i>	R	„É”*
Riboszóma módosítás, konstitutív	<i>erm</i>	R	R

\*Ne közöljük a clindamycin érzékenységet „D-test” vizsgálat nélkül

### A „D-test” vizsgálat kivitelezése: (CLSI -korábban NCCLS- ajánlás)

A vizsgálathoz a rutin diagnosztikában használt eszközök szükségesek:

- Mueller-Hinton táptalaj,
- 2 µg-os clindamycin,
- 15 µg-os erythromycin korong.

A korongokat egymástól 15-26 mm távolságra kell elhelyezni. A teszt kivitelezésében és az inokulum beállításában a standard korong diffúziós eljárást kell alkalmazni. Pozitív eredmény esetén a clindamycin korong körül az erythromycin korong oldali gátlási zóna torzul („D” betű alakú lesz).

### Az eredmények interpretálása:

- **Pozitív D-teszt esetén:** az CLSI (korábban NCCLS) ajánlása szerint mind az erythromycint, mind a clindamycint rezisztensnek kell kiadni, és megjegyzésben leírni: „Indukálható clindamycin rezisztencia.
- **Negatív D-teszt esetén:** Az erythromycint rezisztensnek, míg a clindamycint érzékenynek kell kiadni, és megjegyzésben leírni: „In vitro nem mutatható ki indukálható clindamycin rezisztencia.”

Jorgensen és mtsi. (4) összevetették a „D-test” eredményeit a VITEK2 (bioMerieux, Durham) automata rendszer szakértő programjával. Közleményükből kiderül, hogy a VITEK2 rendszere nem ismeri fel az iMLS<sub>B</sub> fenotípust, ezért ajánlott az automata rendszerek alkalmazása esetén is elvégezni a „D-tesztet”.

Az OEK Bakteriológiai Surveillance adatbázisa alapján megvizsgáltuk a 2004.január-június között izolált *S. aureus* (MSSA és MRSA) izolátumok makrolid és clindamycin rezisztenciáját (2. és 3. táblázat). Az MSSA törzsek 9 %-a, míg az MRSA törzsek 94,7 %-a volt erythromycinre nem érzékeny.

## 2. táblázat

Erythromycin nem-érzékeny MSSA izolátumok clindamycin rezisztenciája az OEK Bakteriológiai Surveillance alapján, 2004. január-június

Erythromycin nemérzékeny MSSA	Rezisztencia fenotípusa	Izolátumok száma	Megoszlás (%)
	Clindamycin érzékeny	738	60,1
	Clindamycin rezisztens	489	39,9
	<b>Összesen</b>	1227	100

### 3. táblázat

Erythromycin nemérzékeny MRSA izolátumok clindamycin rezisztenciája az OEK Bakteriológiai Surveillance alapján 2004 január-június

Erythromycin nemérzékeny MRSA	Rezisztencia fenotípusa	Izolátumok száma	Megoszlás (%)
	Clindamycin érzékeny	35	4,5
	Clindamycin rezisztens	734	95,5
	<b>Összesen</b>	<b>769</b>	<b>100</b>

A clindamycin érzékenység tekintetében jelentős különbség volt az erythromycin nem érzékeny MSSA és MRSA törzsek között. A surveillance adatok szerint az MSSA törzsek 60,1 %-a volt clindamycin érzékeny (2. táblázat). Schreckenberger és mtsai (8) közleményében az erythromycin nem érzékeny/clindamycin érzékeny (E-nÉ/CL-É) MSSA törzsek körében az iMLS<sub>B</sub> fenotípus 20% körül volt. Erre vonatkozóan magyarországi adatok még nem állnak rendelkezésre.

Az MRSA törzseknek 4,5 %-a volt E-nÉ/CL-É fenotípusú (3. táblázat). A szakirodalomban közölt adatok szerint az E-nÉ/CL-É kórházi MRSA törzsek között az iMLS<sub>B</sub> fenotípus aránya 50-84%, míg a CA-MRSA törzseknél 17% körül van.

Az indukálható MLS<sub>B</sub> fenotípus MRSA törzsekben való magyarországi előfordulásának felmérésére a Nemzeti MRSA Referencia Labor 406 törzset vizsgált meg eddig D-tesztel. Ennek eredménye a 4. táblázatban látható.

### 4. táblázat

D-teszt vizsgálatok eredménye erythromycin rezisztens MRSA törzseken (a Nemzeti MRSA Referencia Labor vizsgálata alapján)

Rezisztencia fenotípusa	Törzsek száma	Megoszlás (%)
Clindamycin érzékeny (efflux)	12	3
Indukálható clindamycin rezisztencia (iMLS <sub>B</sub> )	39	9,6
Konstitutív clindamycin rezisztencia (cMLS <sub>B</sub> )	355	87,4
<b>Összesen</b>	<b>406</b>	<b>100</b>

A 4. táblázatban látható, hogy a beküldött, erythromycin rezisztens MRSA törzsek 12,6 %-a mutatkozott in vitro clindamycin érzékenynek rutin korongdiffúziós vizsgálattal.

**Azonban a D-tesztes vizsgálatok megmutatták, hogy ezeknek törzseknek 76,5%-a indukálható clindamycin rezisztenciát mutat.**

A fentiek értelmében ajánlott, hogy a pontosabb eredménykiadás érdekében mindenképpen vizsgáljuk rutinszerűen (az NCCLS ajánlásának megfelelően) a makrolid nemérzékeny/clindamycin érzékeny törzseket „D-tesztel”.

*Tóth Ákos, dr. Gacs Mária*

*Irodalom:*

1. Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ and Ellis-Pegler R. 2001. Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. *J Antimicrob Chemother.* 48:315-29
2. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML and Jorgensen JH. 2003. Practical disc diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negativ staphylococci. *J Clin Microbiol.* 41:4740-44
3. Gerard L, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, and Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:1062-6
4. Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel ML, and Fiebelkorn KR. 2004. Detection of inducible clindamycin resistance of staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 42:1800-1802
5. Leclercq R, and Courvalin P. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 35:1267-72
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Clindamycin Disk Induction Test for *Staphylococcus* spp. (appendix) Supplement M100-S14. National Committee for Clinical Laboratory Standards
7. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, and Seppala H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 43:2823-30
8. Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. 2004. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negativ staphylococci in a community and a Tertiary Care Hospital. *J Clin Microbiol.* 42:2777-9
9. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. 2003. Failure of clindamycin treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clin Infect Dis.* 37:1257-60
10. Thakker-Varia S, Jenssen WD, Moon-McDermott L, Weinstein MP, Dubin DT. 1987 Molecular epidemiology of macrolid-lincosamides-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negativ staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 31:735-43
11. Weisblum B, and Demohn V. 1969. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved. *J Bacteriol.* 98: 447-52
12. Zarrouk V, Bozdogan B, Leclercq R, Garry L, Feger C, Carbon C, and Fantin B. 2001. Activities of the combination of quinupristin-dalfopristin with rifampin in vitro and in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus* strains with various phenotypes of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1244-8



## Dél-német MRSA klón elterjedése Magyarországon 2002-2004 között

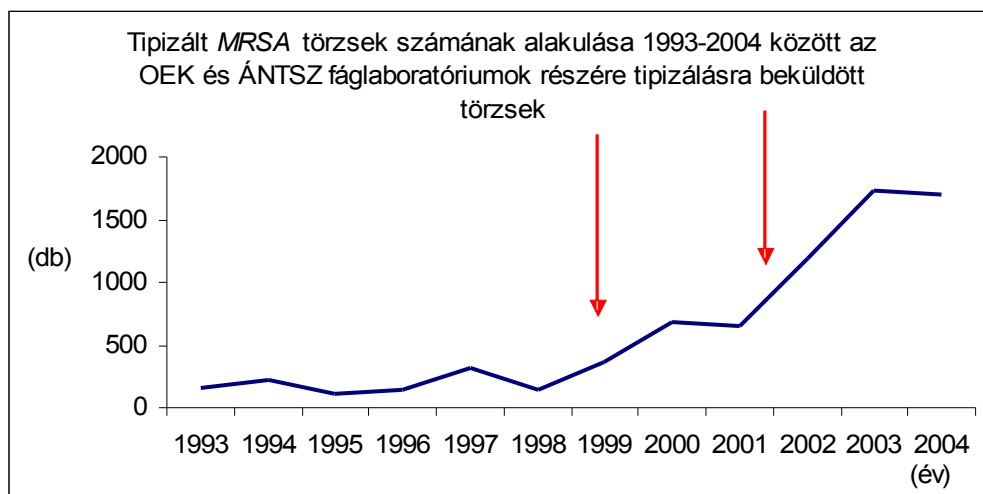
Pászti Judit<sup>1</sup>, Ungvári Erika<sup>1</sup>, Hetzmann Istvänné<sup>1</sup>, Vargáné Hunyadi Zsuzsanna<sup>1</sup>, Füzi Miklós<sup>2</sup>

<sup>1</sup> „Johan Béla” Országos Epidemiológiai Központ, Fágtypizálási és molekuláris epidemiológiai osztály

<sup>2</sup> „Johan Béla” Országos Epidemiológiai Központ, Bakteriológia I. osztály

1980-2004 között az MRSA gyakoriságának növekedése–Nyugat-Európához hasonlóan hazánkban is - megfigyelhető volt. A tipizálásra beküldött törzsek számának alakulása is mutatja ezt a tendenciát, de az izolálás pontos száma nem ismert.

### Tipizált MRSA törzsek számának alakulása 1993-2004 között az OEK és ÁNTSZ fáglaboratóriumok részére tipizálásra beküldött törzsek



1. ábra

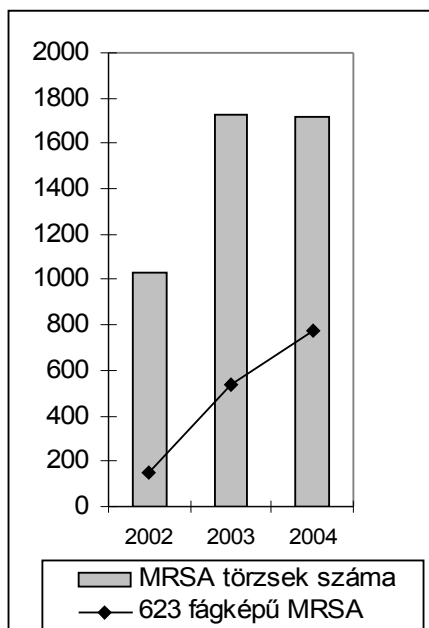
Az 1. ábrán a nyilak azokat az éveket jelzik, melyekben az emelkedés mértéke kiugró volt. Feltételezhető a kimutatottnál nagyobb mértékű emelkedés is, ha figyelembe vesszük a mikrobiológiai laboratóriumok elérhetőségét, a diagnosztika esetleges problémáit és a váladék mintavételi compliance alacsony szintjét.

Az MRSA törzsek előfordulásában bekövetkezett változások háttérében az egyre gyakoribbá váló nosocomialis járványok álltak. A járványok jellemzőinek (specifikus járványok, megbetegedettek száma, meghaltak száma, tipizálási eredmények) összevetésével számos következtetés vonható le (EPINFO 2005. 02. 11):

- MRSA által okozott járványok a vezető helyen álltak;
- Septicus esetekkel járó járványok száma növekedett.

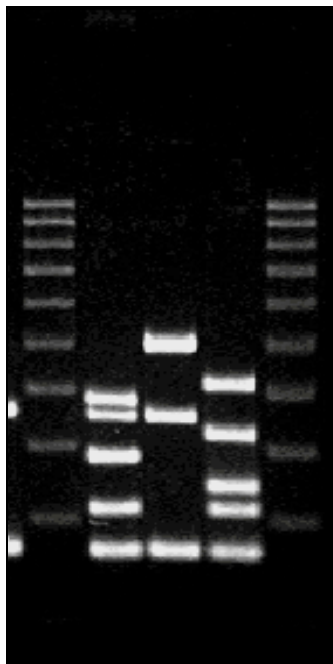
2002 során megfigyelhető volt egy viszonylag egységes feno-genotípust mutató MRSA klón gyakoriságának emelkedése (2001-ben csupán 5 ilyen izolátum fordult elő a tipizálásra küldött anyagok között). E tulajdonságok az alábbiakban foglalhatók össze:

- Alap fágsozozattal 54, 42E/54/95, 54/95 fágkép, III fágcsoport;
- MRSA fágsozozattal 623; 617/623 fágkép
- SCCmec I - *mec* gén tipizálására PCR-es módszerrel: 3. a. ábra (1-4)
- egységes pulzotípus PFGE vizsgálattal: 3. b. ábra (5-7)
- ST228 (ST: szekvencia típus MLST módszerrel, melyet nemzetközi együttműködés keretén belül a Bakteriológia I. osztály segítségével történt) (8-9)



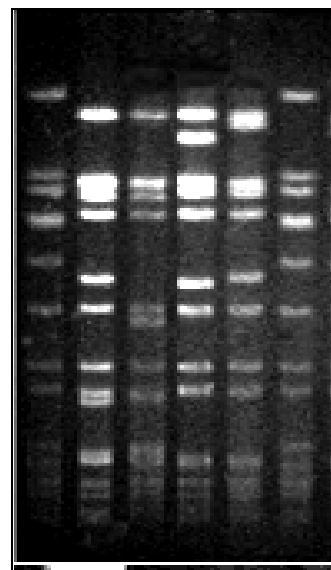
**2. ábra**

Járványos, 623 fágképű klón arányának alakulása az összes vizsgált MRSA tükrében



**3. a. ábra**

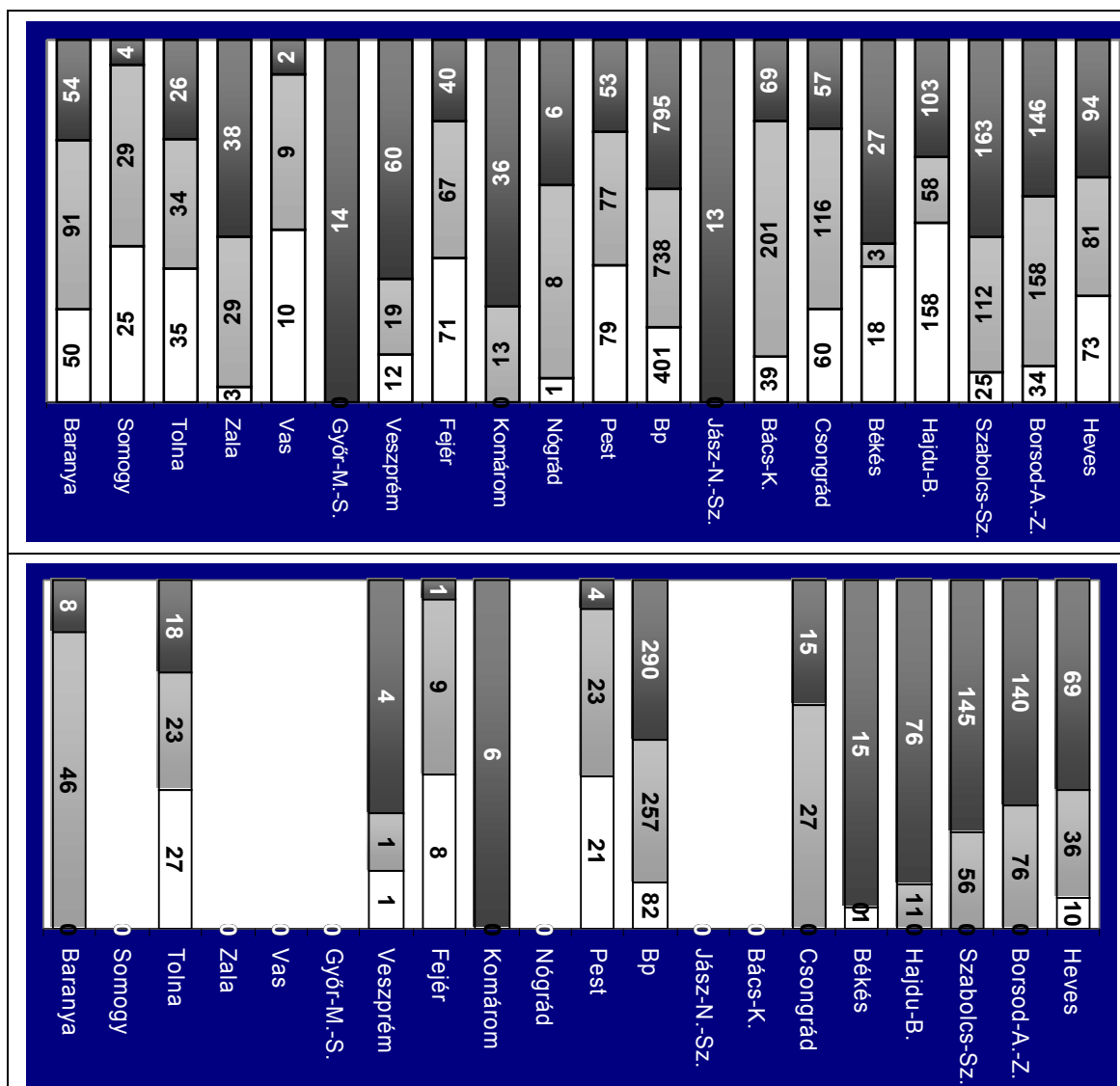
Különböző SCCmec típusok elektroforetikus képe (1: II. típus, 2: I típus, 3: III. típus)



**3. b. ábra**

Járványos, 623 fágképű klón PFGE képe (Tenover szerinti kritériumok alapján fenti törzsek azonos klónba sorolandók)

Hazánkban 2002 és 2004 között a vizsgált MRSA száma, és ezen belül a 623 fágképű klón aránya igen nagy szórást mutat az ország egyes részein. Tipizálásra budapesti kórházakból érkezett a legtöbb MRSA, és a legtöbb járványt is innen jelezték. Jelentős számban került izolálásra az ország keleti részében, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Borsod-Abaúj-Zemplén, de Bács-Kiskun és Csongrád megyékben is. A nyugati országrészben csupán Baranya és Tolna megyéből került beküldésre jelentősebb számban. A 623 fágképű klón összefüggő esetekből első ízben 2002-ben Tolna megyéből, járványból került kimutatásra. 2003-ban a klón főként a fővárosi kórházakban lezajlott járványokban volt kimutatható, majd 2004-re gyakorisága jelentősen nőtt a keleti megyék kórházaiban, kiszorítva a megelőző években előfordult típusokat (klónokat).



4. ábra

A 4. ábrán az összes MRSA (felső grafikon) és 623 fágképu fagtípus (alsó grafikon) alakulása megyénként 2002-2004 között (2002: fehér, 2003: világos szürke, 2004: sötét szürke)

A járványos MRSA klónok előfordulásáról évtizedek óta beszámolnak. Az első leírások epidémiás - EMRSA - klónokról – (EMRSA1, EMRSA3, 60-70' években EMRSA15, EMRSA16 – fág-, antib-, PFGE alapján jellemzett klónok) az Egyesült Királyságból születtek. A 90'-es években számos európai nemzeti laboratórium végzett komplex tipizálási (fág-, mec-, Tn554, stb) eljárást saját országában izolált törzsekkel. Az USA-ban gyűjtött izolátumokból álló reprezentatív mintasorral végeztek összehasonlító vizsgálatokat Európából, a tengerentúlról, különböző országokból származó törzsekkel. A 90'-es évek megfogalmazódott az igény, hogy a különböző laboratóriumokban született eredmények összehasonlíthatóak legyenek egymással (egységes protokollok, munkacsoportok –

HARMONY) és globális epidemiológiai megfigyelésekre legyen lehetőség. A laboratóriumi technikák fejlődésével, a gének szekvenciájának meghatározásával (MLST: **M**ulti **L**ocus **S**equencing **T**yping, ST: **S**equencing **T**ype) ma már lehetővé vált a különböző (epidémiás, endémiás, közösségben szerzett stb) MRSA klónok globális elterjedtségének elemzése és egységes nomenklatúra alkalmazása.

### 1. táblázat MRSA klónok és ST típusaik

Klón	ST (szekvencia típus)
EMRSA-3	ST5- MRSA-I
New York /Japán klón	ST5-MRSA-II
„Pediatric” klón	ST5-MRSA-IV
Ír-2 klón	ST8-MRSA-II
EMRSA-2, -6	ST8-MRSA-IV
EMRSA-15	ST22-MRSA-IV
EMRSA-16	ST36-MRSA-II
Berlin klón	ST45-MRSA-IV
Dél-német klón, Itáliai klón,	ST228-MRSA-I
Brazíliai klón, Magyar klón, EMRSA-1,-4,-11, Bécsi klón	ST239-MRSA-III
Ibériai klón, EMRSA-5,-17	ST247-MRSA- I.A
Hannover klón, EMRSA-10	ST254-MRSA-IV

A hazai leggyakoribb – 623 fágképű – klón ebben a rendszerben (ST228-MRSA-I) az előzőleg leírt un. Dél-német klónnak felel meg.

A Dél-német klón megjelenése 1992-re tehető. Gyakorivá vált Olaszországban is (Itáliai klón elnevezéssel is találkozhatunk). Előfordulásáról beszámoltak Szlovéniában és Szlovákiában is. A rendelkezésre álló statisztikai adatok elemzése mutatja e klón magyarországi elterjedtségét.

### Összefoglalva,

- sajátos epidemiológiai tulajdonsággal rendelkező, egy bizonyos fenotípust reprezentáló klón (623 fágképű = Dél-német klón) terjedése figyelhető meg 2002 óta.
- Az első bejelentett járvány Tolna megyében zajlott le, és 2003-tól É-K-Magyarországon és Budapesten vált gyakorivá;
- Nemzetközi körvizsgálatban MLST módszer segítségével igazolódott, hogy a hazai 623 fágképű epidémiás klón, a Dél-német klónnal azonos;
- További vizsgálatok (MLST) és elemzések szükségesek a gyakoribb hazai klónok azonosításához és az elterjedtség (terjedés) feltárásához – fokozottan virulens klónok monitorozásához.

**Irodalom:**

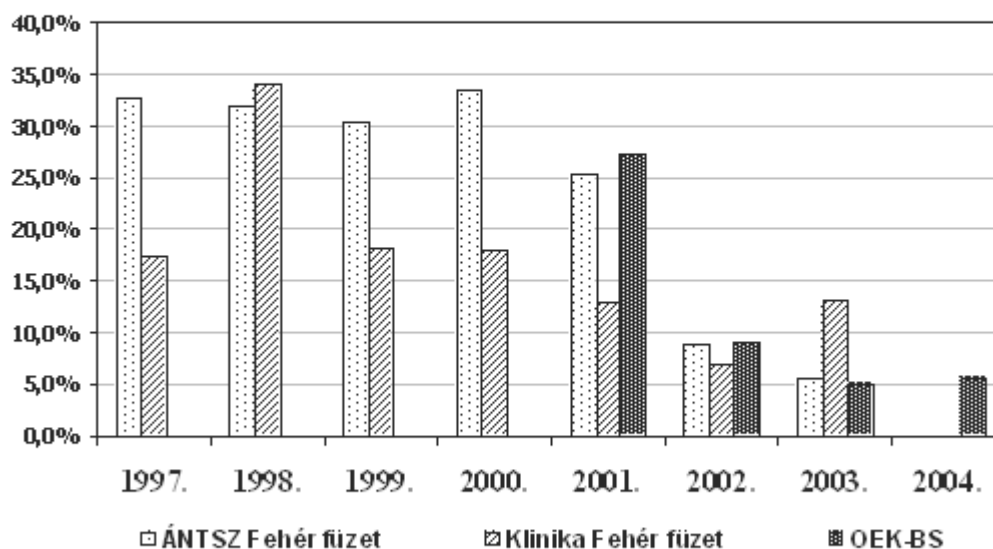
1. **Kreiswirth, B., J. Kornblum, R.D. Arbeit, W. Eisner, J.N. Maslow, A. McGeer, D.E. Low and R.P. Novick.** 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistant in *Staphylococcus aureus*. *Science*. 259: 227-230.
2. **Sanches, I.S., M. Ramirez, H. Troni, M. Abecassis, M. Padua, A. Tomasz and H. de Lencastre.** 1995. Evidence for the geographic spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone between Portugal and Spain. *J. clin. Microbiol.* 33: 1243-1246.
3. **de Lencastre, H., E.P. Severina, H. Milch, M. Konkoly-Thege and A. Tomasz.** 1997. Wide geographic distribution of a unique methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 3: 289-296.
4. **Roberts, R.B., A. de Lencastre, W. Eisner, E.P. Severina, B. Shopsin, B.N. Kreiswirth, A. Tomasz and the MRSA Collaborative Study Group.** 1998. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospital. *J. Infect. Dis.* 178: 164-171.
5. **Birren, B. and E. Lai.** 1993. *Pulsed field gel electrophoresis: A practical guide.* Academic Press, Inc. San Diego, New York.
6. **Cantor, C.R., C.L. Smith, M.K. Mathew.** 1988. Pulsed-field gel electrophoresis of very large molecules. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 17: 287-304.
7. **Birren, B.W., E. Lai, S.M. Clark, L. Hood and M.I. Simon.** 1988. Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acid Research.* 16: 7563-7582.
8. **Enright, M.C., N.P. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock and B.G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1008-1015.
9. **Shopsin, B. and B.N. Kreiswirth.** 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect. Dis.* 7:

## Az OEK Bakteriológiai Surveillance 2004. első félévi adatainak elemzése: a *Streptococcus pneumoniae* antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája

A bakteriológiai surveillance vizsgálatok és a Mikrobiológiai körlevelek elindítása óta szinte folyamatosan foglalkoztunk a *Streptococcus pneumoniae* antibiotikum érzékenységének, elsősorban a penicillinnel szembeni rezisztenciájának vizsgálatával. Azt hihetnénk, hogy már túlságosan sokat is, ha egyrészt egyes laboratóriumok eredményei nem azt mutatnák, hogy még mindig nem eleget, másrészt elemzéseink eredményeként minél hitelesebbek a surveillance-ba szolgáltatott alapadatok, annál realisabb képet kapunk az előfordulás és antibiotikumokkal szembeni rezisztencia változásairól.

Összességében, ahogy már a 2003. évi eredmények értékelésekor is megállapítható volt, a *S. pneumoniae* penicillin rezisztencia szintjében jelentős változás kezdődött el 2001-ben, 2003. évre elért egy a korábnál jóval alacsonyabb és realisabb szintet, de itt megtorpant. Vehetjük-e ezt már egy valós szintnek? A surveillance-ban résztvevő 34 laboratórium eredményei reprezentatívnak tekinthetők, s országos átlagban a *Streptococcus pneumoniae* penicillinnel szembeni rezisztenciájának ez a 6% körüli értéke nagy valószínűséggel elfogadható (1. ábra).

### A *Streptococcus pneumoniae* penicillin rezisztenciája „Fehér füzetek” és az OEK-BS adatai alapján. 1997- 2004. első félév



1.ábra

Nehezebb értékelni azt, hogy a különböző laboratóriumok között a rezisztens törzsek előfordulásának gyakorisága nagyon nagy eltéréseket mutat. Nézzük meg, mi van 2004 első félévének összeredménye a 6% mögött. A rezisztens törzsek előfordulásának %-os

gyakoriságát laboratóriumonként vizsgálva, láthatjuk hogy az értékek 0,0%-tól 16,2%-ig változnak (1. táblázat).

### 1. táblázat

#### A penicillinre nem-érzékeny *S. pneumoniae* bakteriológiai laboratóriumok szerinti bontásban

(2004. január-június OEK-BS.)

Mikrobiológiai laboratórium	összes izolátum db	mérsékelt		rezisztens	
		db	%	db	%
ÁNTSZ Bács-Kiskun megye	24	10	41,7%	0	0,0%
<b>ÁNTSZ Baranya megye</b>	<b>8</b>	0		1	
ÁNTSZ Békés megye	89	21	23,6%	9	10,1%
ÁNTSZ Borsod-Abaúj-Zemplén megye	118	39	33,1%	15	12,7%
ÁNTSZ Csongrád megye	214	98	45,8%	12	5,6%
ÁNTSZ Fejér megye	135	34	25,2%	3	2,2%
ÁNTSZ Főváros	89	38	42,7%	2	2,2%
ÁNTSZ Győr-Moson-Sopron megye	222	24	10,8%	7	3,2%
<b>ÁNTSZ Hajdú-Bihar megye</b>	<b>10</b>	0		0	
ÁNTSZ Heves megye	73	38	52,1%	5	6,9%
ÁNTSZ Jász-Nagykun-Szolnok megye	64	27	42,2%	3	4,7%
ÁNTSZ Komárom-Esztergom megye	184	64	34,8%	1	0,5%
ÁNTSZ Nógrád megye	30	15	50,0%	0	0,0%
ÁNTSZ Pest megye	70	23	32,9%	2	2,9%
ÁNTSZ Somogy megye	26	2	7,7%	4	15,4%
ÁNTSZ Szabolcs-Szatmár-Bereg megye	62	25	40,3%	0	0,0%
<b>ÁNTSZ Tolna megye</b>	<b>8</b>	2		1	
ÁNTSZ Vas megye	52	1	1,9%	0	0,0%
ÁNTSZ Veszprém megye	90	18	20,0%	14	15,6%
ÁNTSZ Zala megye	72	25	34,7%	4	5,6%
Balassa János Kh. Szekszárd	100	23	23,0%	8	8,0%
<b>BM.Központi Kh.</b>	<b>7</b>	0		0	
DOE.Mikrobiológia	81	41	50,6%	7	8,6%
Hetényi Géza Kh. Szolnok	228	82	36,0%	37	16,2%
Kenessey Albert Kh.Balassagyarmat	53	23	43,4%	2	3,8%
<b>Mosdós</b>	<b>38</b>	0	0,0%	18	47,4%
OEK	30	5	16,7%	0	0,0%
Orsz.Korányi TBC	100	19	19,0%	6	6,0%
POTE, Pécs	29	3	10,3%	3	10,3%
PRODIA- SOPRON	222	57	25,7%	23	10,4%
PRODIA-NYÍREGYHÁZA	472	179	37,9%	7	1,5%
PRODIA-Szt.Isván Kh-Budapest	178	34	19,1%	18	10,1%
SZOTE.Klinikai Mikrobiológia	276	129	46,7%	4	1,5%
Szt.László Kh.Budapest	135	29	21,5%	1	0,7%
összes:	<b>3589</b>	1128	31,4%	217	6,1%
Mosdós nélkül	<b>3551</b>	1128	31,80%	199	5,60%

Magas a rezisztens törzsek aránya Szolnokon a Hetényi Géza Kórházban, az ÁNTSZ Veszprém és Borsod-Abaúj-Zemplén megyei Intézetében. Ezzel szemben nagyon alacsony az

ÁNTSZ Komárom megyei Intézete, a Szent László Kórház, a SZTE Klinikai Mikrobiológiai, és a PRODIA Nyíregyháza mikrobiológiai laboratóriumában.

A penicillin rezisztens törzsek előfordulási gyakoriságában észlelhető laboratóriumok közti nagy különbségek, további elemzést kívánnak. Egy részükről, - a surveillance mellett más adatbázisra is támaszkodva - elmondható, hogy még mindig módszertani hibák következményei. Valószínűsíthető ez például akkor, ha egy adott laboratóriumban csak rezisztens törzsek szerepelnek, vagy magasabb a rezisztens törzsek száma a mérsékelt érzékenyekénél. Nem felesleges tehát megismételni az ország minden bakteriológiai laboratóriumának szíve, hogy **a penicillin rezisztencia vizsgálata csak E-tesztel, vagy más módon meghatározott MIC érték alapján lehetséges.**

Felvetődhet az is, hogy valódi területi, vagy intézményenkénti különbségből adódik ez a jelentős szórás. Ha tovább bontjuk, egyes magas rezisztencia értéket közlő laboratóriumok adatait, a vizsgálati anyagot beküldő intézmények szerint, láthatjuk, hogy egy-egy helyen a mérsékelt rezisztens törzsek előfordulását tekintve halmazódások alakulhatnak ki. Például Borsod megyében a miskolci Oktató Kórházban, ahol 16,6%-os a rezisztens törzsek előfordulási gyakorisága, a részletes adatok azt mutatják, hogy ez az átlagnál jóval magasabb érték visszavezethető egy-egy osztály kiugróan magas értékeire. Ugyanígy, Veszprém megyében a pápai kórház csecsemő-és gyermekosztályán egy adott időszakban izolált nagyobb számú rezisztens törzs emeli az átlag fölé az a rezisztens törzsek előfordulásának %-os értékét (2. táblázat).

## 2. táblázat

**A penicillinre nem-érzékeny *S. pneumoniae* előfordulási gyakorisága néhány kiemelt intézményben és osztályon. (2003. január-június és 2004. január-június OEK-BS)**

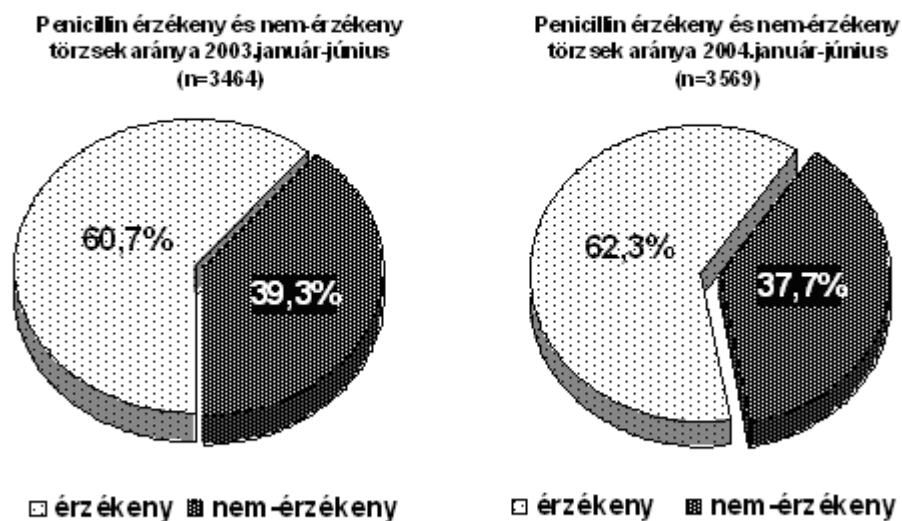
Az intézmény megnevezése	Osztály, vagy szakrendelő	2003. január-június					2004. január-június				
		összes izolátum	M	M%	R	R%	összes izolátum	M	M%	R	R%
Megyei Kórház-Rendelőintézet Szolnok	csecsemő-gyerekek	74	28	37,8%	6	8,1%	134	46	34,3%	24	17,9%
	fertőző	36	16	44,4%	5	13,9%	35	14	40,0%	8	22,9%
	fül-orr-gége	15	8	53,3%	0	0,0%	28	16	57,1%	2	7,1%
<b>Megyei Kórház-Rendelőintézet Szolnok Összesen</b>		<b>162</b>	<b>58</b>	<b>35,8%</b>	<b>12</b>	<b>7,4%</b>	<b>228</b>	<b>82</b>	<b>36,0%</b>	<b>37</b>	<b>16,2%</b>
B.A.Z. Megyei Kórház és Egyetemi Oktató Kórház	csecsemő-gyerekek	47	24	51,1%	4	8,5%	32	12	37,5%	10	31,3%
B.A.Z. Megyei Kórház és Egyetemi Oktató Kórház összes:		92	45	48,9%	7	7,6%	90	34	37,8%	15	16,7%
<b>ÁNTSZ B.A.Z. Megyei Intézete összes:</b>		<b>120</b>	<b>52</b>	<b>43,3%</b>	<b>10</b>	<b>8,3%</b>	<b>118</b>	<b>39</b>	<b>33,1%</b>	<b>15</b>	<b>12,7%</b>
Pápa Gróf Eszterházy Kórház-Szakambulancia	csecsemő-gyerekek	1	0		0		5	2		2	
	fül-orr-gége	11	3	27,3%	0	0,0%	10	2		4	
Pápa Gróf Eszterházy Kórház-Szakambulancia Összes:		12	3	25,0%	0	0,0%	16	4	25,0%	6	37,5%
<b>ÁNTSZ Veszprém Megyei Intézete összes:</b>		<b>93</b>	<b>28</b>	<b>30,1%</b>	<b>7</b>	<b>7,5%</b>	<b>90</b>	<b>18</b>	<b>20,0%</b>	<b>14</b>	<b>15,6%</b>



Szükséges megteremteni a lehetőséget, ezeknek a halmozottan megjelenő mérsékelt rezisztens törzseknek a további azonosító vizsgálatára. A szerotipizálás és a molekuláris vizsgálatok (PFGE, MLST) erre jó megoldást kínálnak.

Az adatokból, ha összehasonlítjuk a 2004. első félévét 2003. év azonos időszakával, azt láthatjuk, hogy az izolálások számában nincs jelentős változás, ugyanígy a penicillinre érzékeny és 'nem-érzékeny' törzsek arányában sem számottevő. Ezt mutatja a 2. ábra.

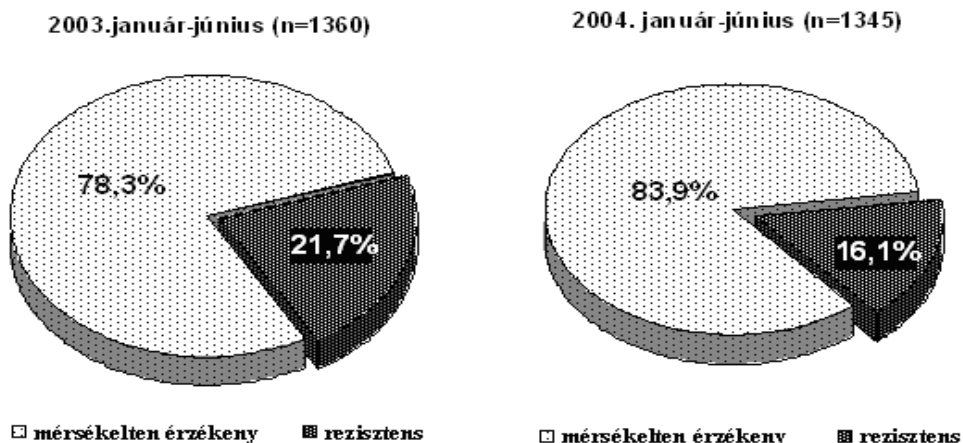
*Streptococcus pneumoniae* penicillinre érzékeny és nem-érzékeny törzseinek aránya 2003. és 2004. év azonos időszakában (OEK BS adatai alapján)



2. ábra

Ezek után nézzük a 'nem-érzékenyek'-en belül a rezisztens és mérsékelt érzékeny törzsek arányát. (3. ábra).

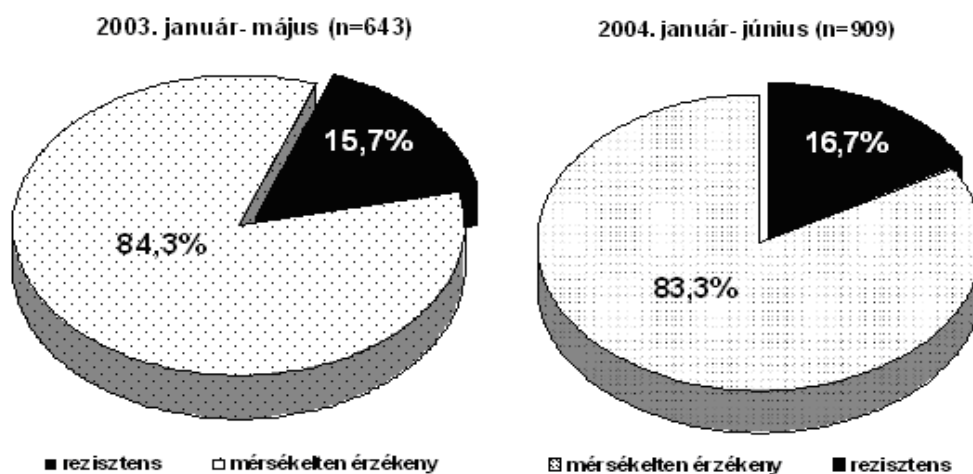
A penicillin nem-érzékeny *S. pneumoniae* törzseken belül a mérsékeltén érzékeny és rezisztens törzsek aránya



3. ábra

A 3. ábra azt mutatja, hogy a rezisztens törzsek aránya jelentősen csökkent az összes vizsgált törzset tekintve, azonban, ha azokat az eredményeket hasonlítjuk össze, amelyknél E-tesztet, vagy más módon MIC érték meghatározás történt (4. ábra), egészen más következtetések vonhatók le.

A *Streptococcus pneumoniae* penicillin nem érzékeny értékeinek megoszlása MIC értékek alapján 2003. és 2004. első félévében



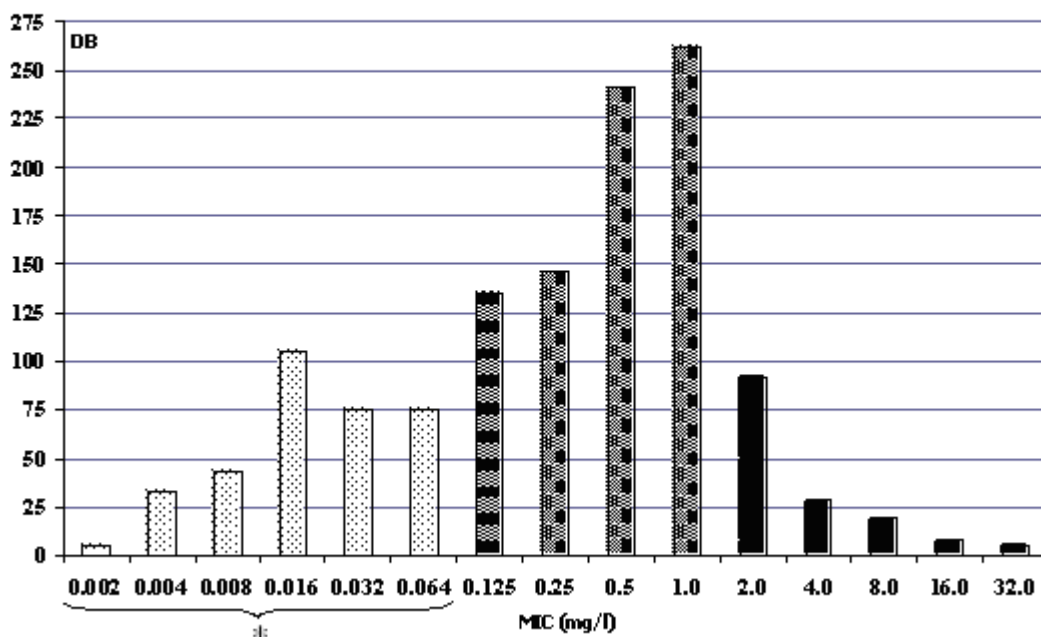
4. ábra

Az adatokból jól látható, hogy a 2003-ban közölt MIC meghatározások száma, a 2004 évinek megközelítőleg csak kétharmada, tehát jelentős számban növekedett 2004-ben a korrektebben meghatározott penicillin érzékenységi vizsgálatok száma. Feltételezhetően, ennek tudható be, hogy ha a MIC vizsgálatok alapján vizsgáljuk 2003 és 2004-ben a nem érzékenyeken belül a rezisztens törzsek arányát, jelentéktelen az eltérés és inkább emelkedő, mint csökkenő tendenciájú. Ezen túlmenően, ha az összes vizsgálat és a MIC vizsgálatok alapján nézzük a rezisztens törzsek arányát, (a 3.-4. ábra 2004 évi adata) gyakorlatilag alig van eltérés, ami arra utal, hogy a surveillance adatokat szolgáltató laboratóriumokban a MIC érték alapján történő meghatározás 2004-ben már általános.

Talán nem korai kimondani, egyes megbízható laboratóriumok eredményeire és egyes intézmények osztályainak kiugró értékeire alapozva, - melyek szerint az elmúlt évihez viszonyítva a rezisztens törzsek számának emelkedése tapasztalható - hogy a penicillinre nem érzékeny és alacsony szinten rezisztens (2-8µg/ml) törzsek száma hazánkban is emelkedni fog.

Folytatódni látszik 2004-ben is az a tendencia, hogy a rezisztenseken belül a magasan rezisztensek aránya csökken. Jól mutatja ezt az 5. ábra, ahol a közölt MIC értékek oszlopdiagramjai láthatók.

***Streptococcus pneumoniae* (n= 1272) mért MIC értékeinek eloszlása (OEK-BS 2004. január-június)**



\*Csak azok a törzsek, amelyeknél MIC meghatározás történt

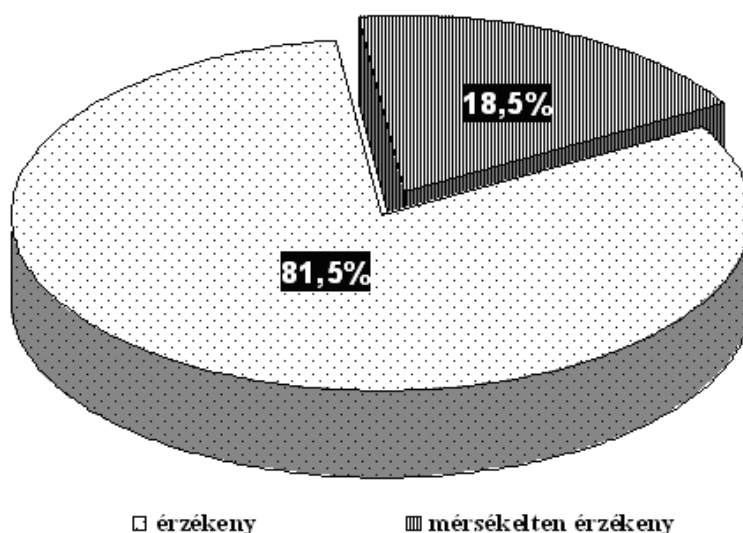
5. ábra

A magasan rezisztens törzsek száma ebben a félévben is nagyon alacsony volt, csak 18 törzs adott  $>8 \mu\text{g/ml}$  MIC értékű eredményt.

A kapott MIC érték helytelen értékelése leginkább a breakpontok körül fordul elő, például az E-teszttel kapott  $1,5 \mu\text{g/ml}$  érték gyakran a mérsékelten érzékeny kategóriába kerül a rezisztens helyett.

A penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek anyag típusonkénti előfordulását vizsgálva 2004. év első félévében, invazív infekcióból származó mintákban (vér, liquor) rezisztens törzs nem fordult elő. Az érzékeny és mérsékelten érzékeny törzsek arányát invazív infekciókban a 6. ábra mutatja.

Invazív mintákból izolált *Streptococcus pneumoniae* (n=92) penicillin érzékenysége (OEK-BS 2004. január-június adatok)



6. ábra

A legtöbb rezisztens törzset fülvadászból izolálták, s a magasan rezisztens törzseknek is, csaknem mindegyike fülvadászból származott.

A *S. pneumoniae* macrolid rezisztenciája változatlanul magas. Ahogy a 3. táblázat mutatja 3485 vizsgált törzs 36 %-a rezisztens erythromycinnel szemben. Intézmények szerint vizsgálva, a 34 laboratórium közül 9-ben 40 %, s ezek közül kettőben 50% feletti a rezisztens törzsek aránya.

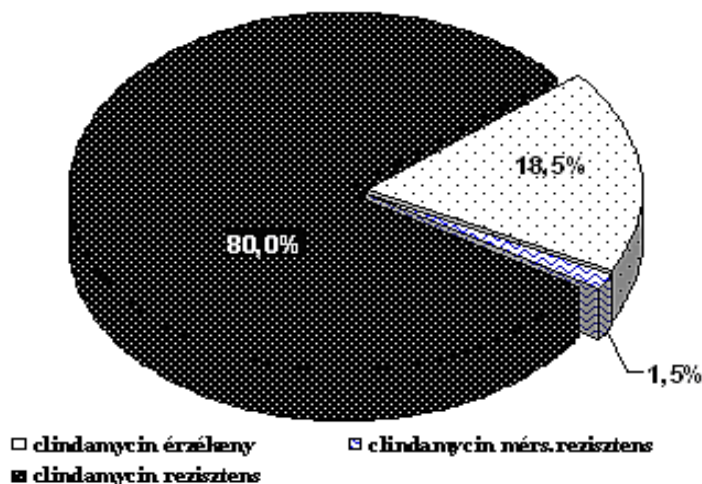
### 3. táblázat

#### *S. pneumoniae* erythromycin rezisztenciája 2004. január-június (OEK-BS)\*

Mikrobiológiai laboratórium	összes izolátum	mérsékelt		rezisztens	
		db	%	db	%
ÁNTSZ Bács-Kiskun megye	24	0	0,0%	5	20,8%
ÁNTSZ Baranya megye	8	0	0,0%	2	25,0%
ÁNTSZ Békés megye	87	1	1,1%	28	32,2%
<b>ÁNTSZ Borsod-Abaúj-Zemplén megye</b>	<b>115</b>	<b>3</b>	<b>2,6%</b>	<b>47</b>	<b>40,9%</b>
ÁNTSZ Csongrád megye	209	9	4,3%	83	39,7%
<b>ÁNTSZ Fejér megye</b>	<b>134</b>	<b>3</b>	<b>2,2%</b>	<b>54</b>	<b>40,3%</b>
ÁNTSZ Főváros	89	3	3,3%	28	31,5%
ÁNTSZ Győr-Moson-Sopron megye	222	20	9,0%	25	11,3%
ÁNTSZ Hajdú-Bihar megye	10	1	10,0%	4	40,0%
<b>ÁNTSZ Heves megye</b>	<b>73</b>	<b>1</b>	<b>1,4%</b>	<b>33</b>	<b>45,2%</b>
<b>ÁNTSZ Jász-Nagykun-Szolnok megye</b>	<b>64</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>31</b>	<b>48,4%</b>
ÁNTSZ Komárom-Esztergom megye	155	4	2,6%	46	29,7%
ÁNTSZ Nógrád megye	30	1	3,3%	9	30,0%
ÁNTSZ Pest megye	70	0	0,0%	24	34,3%
ÁNTSZ Somogy megye	26	4	15,3%	10	38,5%
<b>ÁNTSZ Szabolcs-Szatmár-Bereg megye</b>	<b>62</b>	<b>1</b>	<b>1,6%</b>	<b>26</b>	<b>41,9%</b>
ÁNTSZ Tolna megye	8	2	25,0%	2	25,0%
ÁNTSZ Vas megye	51	0	0,0%	10	19,6%
ÁNTSZ Veszprém megye	88	1	1,1%	35	39,8%
<b>ÁNTSZ Zala megye</b>	<b>70</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>33</b>	<b>47,1%</b>
Balassa János Kh. Szekszárd	100	1	1,0%	36	36,0%
BM.Központi Kh.	7	1	14,3%	0	0,0%
<b>DOTE.Mikrobiológia</b>	<b>76</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>43</b>	<b>56,6%</b>
Hetényi Géza Kh. Szolnok	227	3	1,4%	75	33,0%
Kenessey Albert Kh. Balassagyarmat	53	0	0,0%	19	35,8%
Mosdós	0	0	0,0%	0	0,0%
OEK	30	1	3,3%	9	30,0%
Orsz.Korányi TBC	93	0	0,0%	19	20,4%
POTE, Pécs	26	0	0,0%	8	30,8%
<b>PRODIA- SOPRON</b>	<b>220</b>	<b>1</b>	<b>0,4%</b>	<b>97</b>	<b>44,1%</b>
PRODIA-NYÍREGYHÁZA	470	0	0,0%	185	39,4%
PRODIA-Szt.Isván Kh-Budapest	178	8	4,5%	59	33,1%
<b>SZE.Klinikai Mikrobiológia</b>	<b>275</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>140</b>	<b>50,9%</b>
Szt.László Kh.Budapest	135	4	3,0%	30	22,2%
összesen	3485	73	<b>2,1%</b>	1255	<b>36,0%</b>

Miután a korongdiffúziós eredmények alapján az erythromycin rezisztens törzsek 80%-a clindamycinre is rezisztens (6. ábra), valószínűsíthető, hogy nálunk a macrolid rezisztenciát kódoló gének közül az *ermB* sokkal gyakoribb, mint az efflux mechanizmus alapján kialakuló *mefA* gén által kódolt rezisztencia, amely a clindamycinre nem terjed ki.

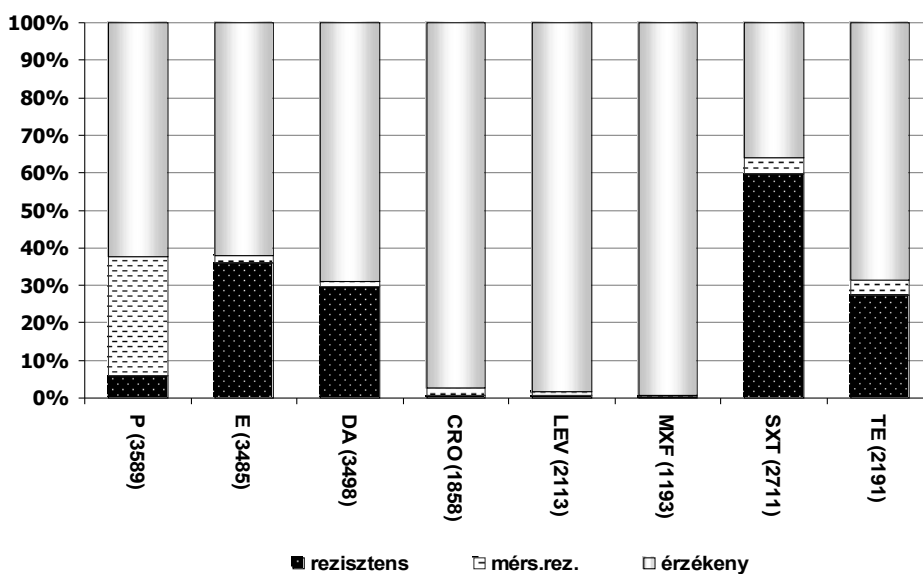
**Erythromycin rezisztens *Streptococcus pneumoniae* clindamycin érzékenysége.**  
(OEK-BS 2004. január-június adatok)



7. ábra

Farrell és mtsai az 1999-2000-ben végzett PROTECT study-ban 25 országból származó macrolid rezisztens *S. pneumoniae*-t vizsgálva, úgy találták, hogy a törzsek 35,3%-a *mefA* 56,2%-a *ermB*, és 6,8 % mindkét gént hordozta. A megoszlás nagyon változó volt földrajzilag és országok szerint. Míg Észak-Amerikában a *mefA* gén, Európában az *ermB* gén dominált. A következő táblázatokon az eddigiek mellett jól látható, hogy még mindig nagyon alacsony a *S. pneumoniae* 3. generációs cefalosporinnal és jelenleg még a quinolonokkal szembeni rezisztenciája is (8. ábra)

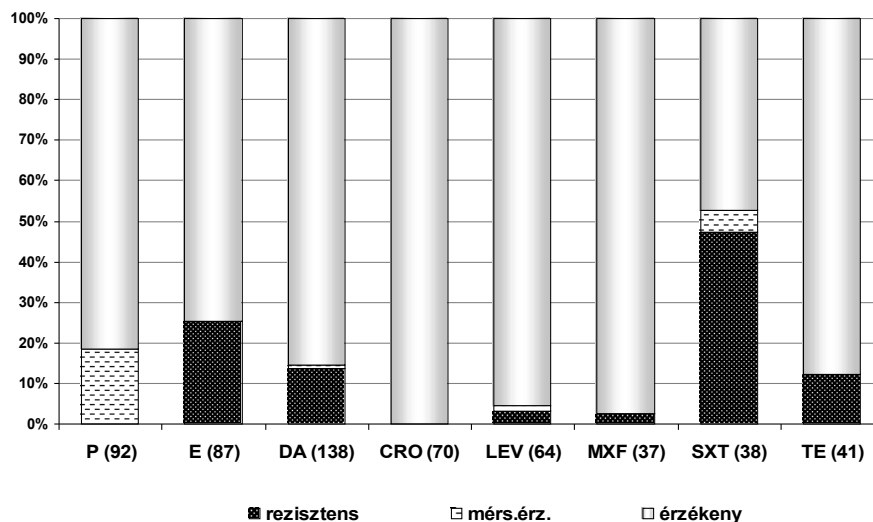
***Streptococcus pneumoniae* antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája (OEK-BS 2004.január-június)**



8. ábra

Az invazív infekciókból származó törzsek általában kevésbé rezisztensek, a quinolonokkal szembeni rezisztencia ugyancsak alacsony, de %-os gyakorisága nagyobb, mint az összes vizsgált törzs esetében (9. ábra).

**Invazív mintákból izolált *Streptococcus pneumoniae* antibiotikumokkal szembeni érzékenysége (OEK-BS 2004.január-június)**



9. ábra

Dr. Gacs Mária, Tirczka Tamás, Libisch Balázs, Dr. Végh Zsolt

Irodalom:

- D.J. Farrell et al. 2003. Macrolid resistance by ribosomal mutation in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT 1999-2000 study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1777-1783.

## A *Bordetella pertussis* fertőzés laboratóriumi diagnosztikája

A *B. pertussis* infekciók laboratóriumi diagnosztizálására alapvetően három módszer áll rendelkezésünkre: a bakteriológiai tenyésztés, a PCR-val történő bakteriális DNS kimutatás és a serológiai vizsgálat.

### 1./ Tenyésztés

A bakteriológiai tenyésztés elsősorban a betegség kezdeti, catarrhalis fázisában lehet sikeres; a paroxysmalis fázisban már jóval kisebb a *B. pertussis* izolálásának valószínűsége. A mintavételt az orron át bevezetett nasopharyngealis tamponnal végezzük, majd a mintát azonnal oltjuk Bordet-Gengou (BG) táptalajra, vagy helyezzük transport közegbe. Az irodalmi adatok alapján erre a célra a legalkalmasabb a Rogen-Lowe agar. Ügyeljünk arra is, hogy a mintát ne gyapot alapú pálcával vegyük, mert az gátolja a *B. pertussis* szaporodását. A tenyésztéshez használt BG táptalajt kiegészíthetjük cephalaxinnel (0.04g/L), ami visszaszorítja a kísérőflóra egy részét megkönnyítve ezáltal a kórokozó izolálását. Az inkubációt levegőn, 35C-on, legalább egy hétig végezzük. Ügyeljünk arra is, hogy a hosszú inkubáció alatt a lemezek ne száradjanak ki.

### 2. / Polimeráz láncreakció /PCR/

A *B. pertussis* fertőzések PCR-rel történő diagnosztikája egyre jobban terjed, mivel a módszer érzékenyebb a tenyésztésnél. A mintavételhez Dacron tampon használata ajánlott, mivel a calcium-alginát a PCR-t gátló anyagokat tartalmaz. Egyes adatok szerint a mintavétel nem feltétlenül szükséges, hogy a nasopharynxből származzon; a torokból vett minta is megfelelő. A minta laboratóriumba szállítása történhet transport táptalajban, fiziológiás sóoldatban, vagy esetleg szárazon is. Mivel a vizsgálat az elpusztult *B. pertussis* baktériumokat is kimutatja, a tenyésztéssel ellentétben általában sikeres a paroxysmalis fázisban, valamint akár egy héttel az antibiotikum terapia megkezdését követően is.

### 3./ *B. pertussis* ellenes antitestek kimutatása

A *B. pertussis* fertőzések diagnosztizálásának legegyszerűbb és legelterjedtebb módja a kórokozó ellenes antitestek kimutatása. A vizsgálat eredményének értékelése ugyanakkor sokszor nem könnyű feladat. Az eredmény egyértelműen pozitívnek tekinthető, ha sikerül savópárt kapnunk és a második mintában az elsőhöz képest, több, mint négyszeres titeremelkedést megfigyelünk. Sajnos savópár vételére nem gyakran van lehetőség és még ritkább, hogy az első mintát még a betegség catarrhalis fázisában vegyék, ami általában a siker előfeltétele. Pertussis ellen oltott betegeknél az egyetlen mintában talált magas IgG titert mindig óvatosan kell értékelnünk. Az IgA jelentős emelkedése ugyanakkor, tipikus tünetek esetén, oltott betegeknél is valószínűsíti a *B. pertussis* fertőzés fennállását. Lényeges, hogy a *B. pertussis* ellenanyagok közül csak a toxin ellen termelődött antitesteket vegyük figyelembe; a haemagglutinin elleni antitestek keresztreakciót adhatnak, a pertactin esetében pedig az immunválasz erőssége nem kielégítő.

#### Irodalom:

- 1./ Loeffelholz, M. J.: *Bordetella* in *Manual of Clinical Microbiology* 8. Kiadás /Szerk.: Murray, P. R. és Tenover, F. C. / Washington, DC 2003, 780-85 és az idézett irodalom.
- 2./ Tozzi, A. E. és Tenover, F. C.: *Diagnosis and management of pertussis*. *Canadian Medical Association Journal* 2005, 172, 509-15 és az idézett irodalom.



## Humán patogén *Plasmodium* speciesek kimutatása és azonosítása seminested-multiplex PCR módszerrel

Horváth Katalin<sup>1</sup>, Szénási Zsuzsanna<sup>1</sup>, Kucséra István<sup>1</sup>, Todorova Roszica<sup>2</sup>, Tárkányi Klára<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Johan Béla' Országos Epidemiológiai Központ, Parazitológiai Osztály, Budapest

<sup>2</sup>Szent László Kórház, Mikrobiológiai Laboratórium, Budapest

A 4 humán patogén *Plasmodium* (*P.*) faj okozta malária a mai napig jelentős helyet foglal el a trópusokon endémiás fertőző betegségek között. A világ körülbelül 100 országában kisebb-nagyobb mértékben számolni kell a *Plasmodium* fertőzés lehetőségével (1, 2). A turizmus, a fejlődő országokkal való együttműködés és a háborúk vagy szocioökonómiai okok kiváltotta migráció a fejlett országokba behurcolt malária esetszámának növekedését idézi elő (1). Magyarországon a maláriát 1963-ban eradikálták. Azóta, az 1963-2004 közötti időszakban 179 magyar és 279 külföldi állampolgárságú személyről számoltak be, akik *Plasmodium* fertőzötten érkeztek Magyarországra. Szerencsére azt mondhatjuk, hogy a szociális és gazdasági fejlődésnek és a viszonylag magas szintű egészségügyi ellátásnak köszönhetően igen kicsi a valószínűsége annak, hogy a malária újra felüti a fejét azon országokban, így Magyarországon is, ahol már a sikeres eradikáció megtörtént (1). Azonban a veszélyt nem szabad alábecsülni, hiszen közzismert tény, hogy a malária terjesztésében szerepet játszó *Anopheles* szúnyog nemzetség Magyarországon is jelen van. Ezért egy megbízhatóan működő surveillance rendszert kell fenntartani a *Plasmodium* mentesség megőrzéséhez. Megbízható surveillance rendszer nem működhet megbízható laboratóriumi diagnosztikai módszerek nélkül. A beteg oldaláról nézve szintén fontos a megbízható diagnózis, hiszen az akár halálos szövődmények elkerüléséhez szükség van a fertőzés korai felismerésére, a pontos és gyors laboratóriumi diagnózisra, és a terápia azonnali megkezdésére (3). A korai felismerés és a terápia felelőssége a klinikusokra hárul, a laboratóriumi dolgozók feladata, vagyis a mi feladatunk a pontos és gyors laboratóriumi diagnózis biztosítása.

Mit várunk el egy jó malária-diagnosztikai tesztől?

- Magas szenzitivitás
- Magas specificitás
- A négy humán patogén *Plasmodium* faj species szintű azonosítása
- Lehetőleg kvantifikálás (legalább a *P. falciparum* esetén)
- Könnyű kivitelezhetőség
- Gyors leletátfordulási idő
- Helyben születő eredmény

A malária fertőzés diagnosztizálásának hagyományos, a mai napig a legelterjedtebb módja a beteg vérmintájából készített Giemsa módszerrel festett vastagcsepp és vérkenet mikroszkópos vizsgálata. Ha a minta kellően nagy számú parazitát tartalmaz, a fertőzést okozó *Plasmodium* fajsztinten nagy pontossággal és kellően gyorsan meghatározható. A mikroszkópos vizsgálat érzékenységének alsó határa körülbelül 5-20 parazita/ $\mu$ l. Legnagyobb hátrányként említik, hogy a vizsgálat nagy jártasságot és tapasztalatot igényel, valamint a több *Plasmodium* fajjal egyidőben való, kevert fertőzéseket olykor nem sikerül azonosítani, az alacsony parazitémia miatt a kisebb számban jelenlévő *Plasmodium* faj kimutatása elmarad (1).

Az utóbbi években elterjedt, a vérben keringő *Plasmodium*-antigének immunokromatográfiás kimutatásán alapuló gyorsdiagnosztikai tesztek nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. Magának a tesztnek a kivitelezése nagyon egyszerű, a leolvasás nemkülönben. A

fajszintű identifikálás általában csak a *Plasmodium falciparum* fertőzés esetén lehetséges, a *Plasmodium vivax*, *ovale* és *malariae* fajok azonos jelet mutatnak. Nagy hátránya a tesztnek, hogy alacsony parazitémia esetén a szenzitivitása alacsony (csak >100 parazita/μl esetén válik a szenzitivitás 90% felettivé), és sikeres kezelést követően is jelenlévő perzisztáló antigén kimutatása miatt fals pozitív eredményt adhat egy már gyógyult betegnél. Ezeket a gyorsdiagnosztikai tesztek eredetileg azért fejlesztették ki, hogy a nagy tapasztalatot igénylő mikroszkópos vizsgálat helyett végezhető a kevés tapasztalattal rendelkező laboratóriumok. Ironikus módon azonban jelenleg a gyors tesztek (kizárólagos) alkalmazása a helytelen diagnózisok számát növelheti, ezért alkalmazásukat mindig ki kell egészíteni hagyományos mikroszkópos vizsgálat, esetleg PCR vizsgálat (3,5).

A polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálat a *Plasmodium* fajok legérzékenyebb, és legspecifikusabb módon történő azonosítására alkalmas. A PCR vizsgálat <5 parazita/μl kimutatására is alkalmas, az általunk alkalmazott PCR módszer érzékenysége is hasonló. Egyes irodalmi hivatkozások azonban 0,004 parazita/μl érzékenységi küszöbről számolnak be (4). Szükségünk van-e nekünk ilyen rendkívüli érzékenységre? Egy átlagos felnőtt embert véve alapul a 0,004 parazita/μl parazitémia azt jelenti, hogy az illető kb. 5000 ml-nyi vértérfogatában 20 000 parazita található, nem számolva az esetlegesen megbújó *Plasmodium* alakokat. Amíg klinikai vizsgálatok nem támasztják alá, hogy az ilyen alacsony mértékű parazitémia soha nem okoz klinikai tüneteket, és nem igényel kezelést, nem engedhetjük meg magunknak, hogy ne az elérhető legérzékenyebb módszert használjuk (4).

PCR vizsgálat hátrányaiként a következőket említik:

- felszerelés igényes
- szaktudás igényes
- mintaszállítás a referencia laboratóriumba időigényes, bonyolult
- lassú
- drága.

Barker 1994-ben a következő kijelentést tette: „In cases where clinical disease can be diagnosed relatively rapidly at the species level... PCR will provide little advantage. Diagnosis of acute malaria represents an example of this.” („Azokban az esetekben, ahol a betegség diagnózisa viszonylag gyorsan felállítható és a kórokozó fajszinten meghatározható, a PCR kevés előnnyel szolgál. Az akut malária diagnózisa erre az egyik példa.”) (6) A szemléletmód az azóta eltelt 10 évben megváltozott. Az imént felsorolt hátrányok nagy része valójában nem jelent komoly akadályt.

- Felszerelés igényes és szaktudás igényes: egy molekuláris vizsgálatokat végző laboratóriumban a felszerelés és a szaktudás már rendelkezésre áll, külön beruházásra nincs szükség.
- Mintaszállítás időigényes, bonyolult: ez elsősorban szervezés kérdése, a mintákat postai úton, vagy az ÁNTSz hálózat laboratóriumaiból autóval be lehet küldeni a referencia laboratóriumba
- Lassú: lassabb ugyan, mint a néhány órát igénybe vevő mikroszkópos vizsgálat, és az 1 órán belül elvégezhető immunkromatográfiás gyors teszt, de a munkaszervezésnek köszönhetően 24 órán belül eredményt tudunk közölni. A bevezetés alatt álló LightCycler PCR módszerrel a minta beérkezésétől számítva 3 órán belül eredményt adunk.
- Drága: sajnos, ezt nehéz volna cáfolni.

Mikor igazán hasznos a PCR módszer?

- 1) *Plasmodium* fertőzésre gyanús betegek esetében, ha többszöri mikroszkópos vizsgálat után sem sikerül a parazitát kimutatni
- 2) Ellentmondó laboratóriumi eredmények esetén
- 3) *Plasmodiumok* fajszintű azonosítására (ha a mikroszkópos vizsgálattal ez nem lehetséges)
- 4) Kezelés eredményességének követésére (különösen gyógyszerrezisztens *Plasmodiummal* való fertőződés veszélye esetén)
- 5) Mikroszkópos és gyorsesztekkel történő laboratóriumi vizsgálatok minőségi (qualiti) kontrolljaként
- 6) Körvizsgálatok szervezése esetén a szervező laboratórium alátámaszthatja a várt eredmény megalapozottságát (1)

A Parazitológiai Osztály „Egzotikus Paraziták Okozta Megbetegedések Nemzeti Referencia Laboratóriumában” seminested multiplex malária PCR-t alkalmazunk, amely két lépésben képes kimutatni, és fajszinten azonosítani valamennyi humán patogén *Plasmodium* fajt. A DNS kivonását a QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kittel végezzük, a gyártó utasításainak megfelelően. A malária faj kimutatása és azonosítása nested, vagyis kétlépéses PCR-rel történik, majd az amplifikáció termékét 3%-os, etídium bromiddal festett agaróz gélen történő elektroforézis során mutatjuk ki, meghatározva a termék méretét. Az első PCR során két terméket kaphatunk. Az egyik a belső pozitív kontroll szerepét betöltő 231 bp-os részlete a humán 18S rRNS génnek, amelynek mindig meg kell jelenni. Hiánya a PCR reakció gátlására utal. Az első PCR másik lehetséges terméke kb. 800 bp-nál jelenik meg, ez a termék a *Plasmodium* fajok 18S rRNS génjének közös szakaszát mutatja ki, jelenléte *Plasmodium* fertőzés fennállását igazolja. A második PCR reakció ennek a 800 bp-nyi szakasznak a fajspecifikus régióra tervezett primerpárok segítségével species szinten azonosítja a négy humán patogén *Plasmodium* fajt, ennek végeredményét a gélen eltérő méretű amplifikációs termékek jelzik (1. ábra). Értelemszerűen egynél több specifikus csík megjelenése kevert fertőzésre utal.

#### 1. ábra helye

2004-ben történt bevezetése óta 29 esetben végeztünk PCR vizsgálatot. Az ország különböző laboratóriumaiból konfirmációra érkező minták mellett a vizsgálati mintáink nagy részét a Szent László Kórház Mikrobiológiai Laboratóriumában mikroszkóposan vizsgált és *Plasmodium* negatívnak bizonyult vérminták jelentették. A PCR vizsgálatok eredménye összhangban volt a mikroszkópos vizsgálat eredményével: 2 esetben igazoltunk *P. falciparum*, 1-1 esetben *P. vivax* illetve *P. ovale* fertőzést, és 1 esetben, ahol a mikroszkópos vizsgálat alapján a kórokozó fajt nem lehetett egyértelműen azonosítani, *P. ovale* és *P. malariae* kevert fertőzést mutatott ki a PCR módszer.

Két tanulságos példát szeretnénk bemutatni. 2005 januárjában a Szent László Kórház Mikrobiológiai Laboratóriumából kaptunk EDTA-s vérmintát egy kameruni betegről, akit hazájában többször kezeltek *P. falciparum* fertőzéssel. A László Kórházba malária gyanújával került felvételre. A beteg mintájának mikroszkópos vizsgálata a *Plasmodium* fertőzés fennállását alátámasztotta, de a kis parazitaszám miatt a fajszintű meghatározás nehézségekbe ütközött. A Szent László Kórház Mikrobiológiai Laboratóriuma *P. malariae?*, *P. ovale?* megjegyzéssel adta ki az eredményt, és a fajszintű azonosításhoz kérte a segítségünket. A beteg EDTA-s vérmintájának feldolgozásával az immunkromatográfiai gyorsesztek kétes nem *falciparum* eredményt adott, a PCR vizsgálat *P. malariae*-*P. ovale* kevert fertőzést mutatott ki.

2005 februárjában Kenézy Gy. Kórházból (Debrecen) kaptunk vastagcseppet és vérkenetet egy *Plasmodium* fertőzésre gyanús külföldi állampolgárságú betegtől. A betegnek több hónappal korábban volt *P. falciparum* fertőzése, amelyet kezeltek. A beküldött minták mikroszkópos vizsgálata nem mutatta ki *Plasmodium* jelenlétét, és a vastagcsepp kaparékából indított PCR vizsgálat is negatív volt. Ennek ellenére kértünk a betegtől EDTA-s vérmintát, hogy megfelelő mennyiségű mintából kiindulva megismételhessük a PCR vizsgálatot. Az EDTA-s vérmintából készített vastagcsepp és vérkenet mikroszkóposan negatív eredményt adott, immunkromatográfiás gyorseszttel azonban egyértelműen *P. falciparum* pozitív jelet kaptunk. A PCR vizsgálat negatív lett, a mikroszkópos vizsgálat eredményét igazolta. Nagy bizonyossággal kijelenthetjük tehát, hogy az immunkromatográfiás gyorseszttel, ahogy arra az irodalomban számtalan figyelmeztetést találtunk, a korábban lezajlott *P. falciparum* fertőzésből visszamaradt perzisztáló antigén jelenlétét mutatta ki.

**1. táblázat.** A diagnosztikai tesztekkel szemben támasztott elvárások és az egyes diagnosztikai módszerek összevetése

Szempont	Mikroszkóp	Gyorseszt	PCR	Real-time PCR
<b>Szenzitivitás</b>	++	+	+++	+++
<b>Specifitás</b>	+++	-	+++	+++
<b>Faj azonosítása</b>	+++	+	+++	+++
<b>Kvantifikálás</b>	+	-	-/+	+++
<b>Könnyű kivitelezés</b>	-/+	+++	-	-
<b>Gyors leletátford. Idő</b>	++	+++	-	++
<b>Helyben eredmény</b>	-/+	+++	-	-

Az 1. táblázatból kitűnik, hogy valamennyi diagnosztikai módszernek megvan a maga erős és gyenge oldala. Véleményünk szerint egy referencia laboratóriumban van létjogosultsága egy olyan molekuláris módszer diagnosztikai sémába való beillesztésének, amely lehetőséget ad a humán patogén *Plasmodium* fajok érzékeny kimutatására, és a téves diagnózisok kiküszöbölésére.

#### Irodalomjegyzék

1. Rubio J. M. et al.: Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol* 1999, 37. 3260-3264
2. <http://www.cdc.gov>
3. Rubio J. M. et al.: Limited level of accuracy provided by available rapid diagnostic tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *J Clin Microbiol* 2001, 39. 2736-2737
4. Hänscheid T., Grobusch M. P.: How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trend Parasitol* 2002, 18. 395-398
5. Hänscheid T., Valadas E.: Poor accuracy of rapid diagnostic tests and misdiagnosis of imported malaria: are PCR-based reference laboratories the answer? *J Clin Microbiol* 2002, 40. 736-737
6. Barker R.H., Jr.: Use of PCR in the field. *Parasitol Today* 1994 10. 117-119