



2007. VII. évfolyam 2. szám

Tartalom:

A *Helicobacter pylori* infekciók laboratóriumi diagnosztikája

Szikra Lenke, Székely Iván

Antigénkombinációk alkalmazásának jelentősége a Lyme szerológiai diagnosztikában

Kienle Zsuzsa, Boross Katalin

Az ornithosis laboratóriumi diagnosztikai módszereinek fejlesztése I.

Balla Eszter, Petrovay Fruzsina

A 2006. évi körkísérlet értékelése

Gacs Mária

Szakmai észrevételek, javaslatok, hozzászólások:

A Mikrobiológiai Körlevél ezen számának megjelentetését a Bayer Hungária Kft. támogatta.

A *Helicobacter pylori* infekciók laboratóriumi diagnosztikája

Szikra Lenke, Székely Iván*

A *Helicobacter pylori* fertőzés a világ népességének mintegy kétharmadát érinti, valószínűleg a leggyakoribb krónikus bakteriális infekció. A fejlett országok lakosságának kb. 30-50%-a fertőzött, míg a fejlődő országokban ez az arány csaknem 100%-os. A kórokozó hazai elterjedtsége meghaladja a 60%-ot. A fertőződés döntően a gyermekkorban alakul ki. Faeco-orális, vagy gastro-orális úton terjed; transzmisszió lehetséges betegről betegre, a kontaminált orvosi eszközök útján (szondák, endoszkópok).

Gyógyszeres eradikáció nélkül a fertőzés egész életen át fennmaradhat.

A *H. pylori* infekció az esetek döntő többségében acut gastritist okoz, ami enyhe tünetekkel jár. A fertőzöttek kis részénél spontán gyógyulás következhet be, túlnyomó részükben azonban krónikus aktív gastritis alakul ki, melynek talaján súlyosabb kórképek, mint pl. peptikus fekély, krónikus atrófiás gastritis, MALT lymphoma, gyomor carcinoma is kialakulhat. A WHO I. osztályú carcinogénnek sorolta be a *H. pylori* baktériumot.

Érthető, hogy a fertőzés kimutatása alapvetően fontos a kialakult betegségek gyógyítása, illetve a fekélybetegség kiújulása, a gyomor carcinoma megelőzése szempontjából is.

A *H. pylori* fertőzés kimutatására számos diagnosztikai módszerrel rendelkezünk. A vizsgálati módszerek egy részénél a kórokozó kimutatása közvetlenül az endoszkóppal vett gyomor biopsziás mintából történik. Ezeknek az invazív módszereknek az előnye, hogy képet lehet alkotni a gyomornyálkahártya állapotáról. A sikeres diagnózis érdekében azonban néhány körülményre tekintettel kell lenni:

- a baktériumok nem egyenletesen, hanem foltokban helyezkednek el a gyomornyálkahártyán, ezért a mintát több helyről kell venni,
- az antibiotikum kezelés jelentősen csökkenti a baktérium számot; vagy több mintát kell venni, vagy a terápia befejezését követően hosszabb időnek kell eltelnie (két-három hét) a biopszia elvégzéséig.

Invazív módszerek:

1. A **gyors ureáz teszt**: a baktérium ureáz enzim aktivitását használja ki, egyszerű, gyors és olcsó vizsgálat, szenzitivitása 90% körüli, specifitása 95% felett van (10^3 – 10^4 CFU/ml baktérium szükséges a pozitivitáshoz).

Endoszkópos vizsgálatot igénylő beavatkozásoknál elsősorban a gyors ureáz tesztet ajánlják, előnye, hogy röviddel a mintavétel után (maximum 24 óra) eldönthető, hogy a beteg fertőzött-e.

Hátránya, hogy vérző fekély esetén hamis negatív eredményt adhat.

2. A biopsziás minta **szövetteni vizsgálata** a *H. pylori* diagnosztika „gold-standardja”. Előnye, hogy a baktérium kimutatása mellett a nyálkahártya morfológiai elváltozásai is diagnosztizálásra kerülnek. Hátránya kis számú baktérium esetén szenzitivitása alacsony, valamint a kimutatás nagymértékben függ a vizsgáló gyakorlottságától. Szenzitivitása aktív vérzés és az eradikációs kezelés után csökken. Elsősorban az ureáz negatív esetekben ajánlják második módszernek.

3. A *H. pylori* **tenyésztése** biopsziás mintából a legspecifikusabb módszer, szenzitivitása azonban nagyban függ a mintavételi, szállítási és laboratóriumi körülményektől. A tenyésztés nélkülözhetetlen a baktérium tulajdonságainak felderítésében és az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokban, azonban idő- és költségigényes volta miatt semmiképpen nem tekinthető a rutin diagnosztika módszerének. A sikeres tenyésztéshez azonban néhány alapelvvel tisztában kell lenni.

- Fontos a megfelelő mintavétel; a biopsziás minta vételének legalább három különböző helyről kell történnie, figyelembe kell venni, hogy a dezinficiálószeres maradékok, valamint a protonpumpa bénító gyógyszerek gátolhatják a *H. pylori* szaporodását.
- Fontos, hogy a biopsziás minta azonnal transzport közegbe (Stuart transzport, vagy Portagerm pylori) kerüljön, mert a baktérium nagyon érzékeny a kiszáradásra.
- Jobb lesz a tenyésztési eredményünk, ha a biopsziás mintát feldolgozás előtt 0,5 ml steril fiziológiás NaCl oldatban 10-20 másodpercig homogenizáljuk. Ennek a műveletnek az a célja, hogy a mucosa felületére tapadt baktériumok kiszabaduljanak.
- Minden mintát legalább két táptalajra kell oltani, ebből az egyik szelektív táptalaj legyen. Bármilyen jó minőségű agar táptalaj megfelelő (Columbia, csokoládé, agy-szív infúziós, vagy Brucella agar, stb.), amit 7-10 % vérrel, K vitaminnal és heminnel egészítünk ki.
- A szelektivitást antibiotikumokkal érhetjük el (Dent Oxoid SR 147 supplement vancomycint, trimethoprimet, cefsulodint és amphotericint tartalmaz). Frissen készült, „nedves” táptalaj használata nagyon fontos, ennek figyelmen kívül hagyása a leggyakoribb oka a laboratóriumi kudarcnak.
- A beoltott táptalajokat mikroaerofil és magas relatív páratartalmú közegben kell inkubálni 7-10 napig 35 ± 2 °C-on.

A *H. pylori* tenyésztésének a legnagyobb jelentősége a mindennapi gyakorlat számára az antibiotikumokkal szembeni érzékenység meghatározásában van. Az érzékenységi vizsgálatra vonatkozó szabályok 1999-ben kerültek leírásra az NCCLS (ma CLSI) kiadványában. Ezek az előírások a mai napig változatlanok.

A rezisztencia vizsgálathoz minimális gátló koncentráció (MIC) értéket kell meghatározni agarhígításos módszerrel, amely lényegében a szokásos eljárástól csak annyiban tér el, hogy figyelembe kell venni a baktérium speciális tenyésztési sajátosságait (hosszabb inkubációs idő, speciális környezet) a CLSI 2006 kiadványa szerint.

Az NCCLS/CLSI szabálykönyv a clarithromycinre vonatkozóan tartalmaz határértéket:

A *H. pylori* törzs érzékeny 0,25 µg/ml, mérsékelten érzékeny 0,5 µg/ml, és rezisztens 1 µg/ml érték esetén.

A clarithromycin rezisztencia meghatározására ma már molekuláris módszer is rendelkezésre áll. A clarithromycin rezisztenciáért felelős mutáns gént közvetlenül a biopsziás mintából mutatják ki, fluorescens in-situ hibridizációs (FISH) technikával. A vizsgálat paraffinba ágyazott hagyományos szövettani metszeten végezhető.

4. Molekuláris módszerek: a polimeráz láncreakció során a *H. pylori* DNS specifikus szakaszát mutatják ki. A módszer rendkívül specifikus (100%), hátránya azonban, hogy költségigényes, megfelelően felszerelt laboratóriumot és képzett személyzetet igényel. Hátránya továbbá az is, hogy nem bizonyítja a baktérium életképességét és nem alkalmas az antibiotikum érzékenység meghatározására. Az eddigi összehasonlító vizsgálatok nem mutattak előnyt a hagyományos, olcsóbb módszerekkel szemben a rutin diagnosztika területén, így a molekuláris technika ma főleg kutatási szempontból jelentős (pl. epidemiológiai vizsgálatokban a baktérium transzmissziójának követése, rezisztencia gének, virulencia faktorok génjeinek kimutatása, stb.).

Nem invazív, endoszkópiát nem igénylő diagnosztikus módszerek:

1. Urea kilégzési teszt: ez a vizsgálat is a baktérium ureáz enzim aktivitásához kötött. Egyszerű, könnyen kivitelezhető módszer, hátránya, hogy drága, mert speciális mérőműszert igényel, és így a vizsgálat csak meghatározott centrumokban végezhető el. A módszer alkalmas mind a *H. pylori* fertőzöttség kimutatására, mind az eradikáció sikerességének ellenőrzésére, valamint a gyermekek vizsgálatára. Ez a módszer a nyugati országokban vezető helyen, referencia módszerként szerepel a diagnosztikában. Tudni kell azonban, hogy protonpumpa gátló gyógyszerek és H₂ receptor blokkolók, valamint antibiotikumok rendszeres szedése esetén a vizsgálat eredménye álnegatív lehet.

2. Szerológiai vizsgálatok:

A *H. pylori* a fertőzöttek 98%-ban szisztémás immunválaszt vált ki. Az antitest szint értékelhető mérésére az ELISA rendszerű diagnosztikus kitek alkalmazhatók. Tekintettel arra, hogy a *H. pylori* okozta infekció általában egy krónikus folyamat a diagnosztikában csak azok az ELISA rendszerek használhatók, amelyek az IgG ellenanyagokat mutatják ki a vérből. A szerológiai

vizsgálatnak létjogosultsága van a *H. pylori* infekció diagnosztikájában, több esetben is:

- vérző fekélyek esetén, amikor az invazív diagnosztikus módszerek al-negatív eredményt adhatnak,
- atrófiás gastritis, illetve MALT lymphoma esetén, amikor a gyomor nyálkahártyában alacsony csíraszámúak vannak jelen a baktériumok,
- fennálló protonpumpa gátló terápia esetén,
- továbbá gyermekek vizsgálatánál. Itt kell megjegyezni, hogy nem minden kereskedelmi kit hitelesített gyermektől származó vérek vizsgálatára. A felnőttekre érvényesített cut-off érték túl magas lehet gyermekek számára, ami a teszt alacsony szenzitivitását eredményezi. Ezért gyermekek *H. pylori* szerológiai vizsgálatánál olyan ELISA kitet kell választani, amelyik tartalmaz cut-off értéket gyermek savók vizsgálatára is.

Epidemiológiai tanulmányok végzésére elsősorban a szerológiai tesztek ajánlottak.

A szerológiai gyors tesztek, az ún. „doktor tesztek” (latex agglutináció, immunkromatográfiás módszerek), minthogy szenzitivitásuk és specificitásuk nem megfelelő, alkalmazásuk rutin laboratóriumi vizsgálatra nem ajánlott.

3. *H. pylori* antigén kimutatás székletből:

Ma már Magyarországon is lehetőség van *H. pylori* antigén székletből történő kimutatására ELISA módszerrel. Klinikai tanulmányok igazolták ennek a módszernek a magas szenzitivitását (98%) és specificitását (96%). Ez a módszer alkalmas a *H. pylori* fertőzés diagnosztizálására és az eradikáció kontrollálására, gyermekek vizsgálatára. Előnye az urea kilégzési teszttel szemben, hogy nem igényel költséges műszer beruházást, a vizsgálati minta (széklet) postai úton szállítható, így bármely mikrobiológiai laboratóriumban, ahol ELISA technika rendelkezésre áll, a vizsgálat elvégezhető.

Újabban kerültek forgalomba a *H. pylori* antigén székletből történő kimutatására immunkromatográfiás diagnosztikus módszerek. Ezek érzékenysége és specificitása eléri az ELISA technikával kapott eredményeket, előnyük viszont az, hogy lényegesen olcsóbbak.

A Magyar Gastroenterológiai Társaság Konszenzus Konferenciájának ajánlása alapján a következő esetekben kell a *H. pylori* fertőzés kimutatására törekedni:

- 45 év alatti ulcus típusú dyspepsiás betegnél, ha nincs alarmtünet,
- a beteg anamnézisében peptikus fekélybetegség szerepel és folyamatos vagy intermittáló savszekréciót gátló kezelést igényel,
- gastro-oesophagealis reflux betegség (GERD) esetén, ha tartós protonpumpa gátló kezelés várható,
- idős betegnél, ha tartós, nem-szteroid gyulladásgátló (NSAID) kezelés várható,
- a beteg egyenes ági rokonainál gyomorrák fordult elő,

- a beteg kifejezett kérésére.

Ezekben az esetekben a házi orvos kezdeményezheti a *H. pylori* fertőzés kimutatását és pozitív esetben az eradikációt; a diagnosztikára a nem invazív módszerek ajánlottak.

45 év feletti, vagy alarmírozó tünetekkel rendelkező betegeknél a diagnózis tisztázása a gastroenterológus feladata, amely általában endoszkópos vizsgálatot és biopsziát von maga után.

Tünetmentes egyének *H. pylori* szűrése felesleges!

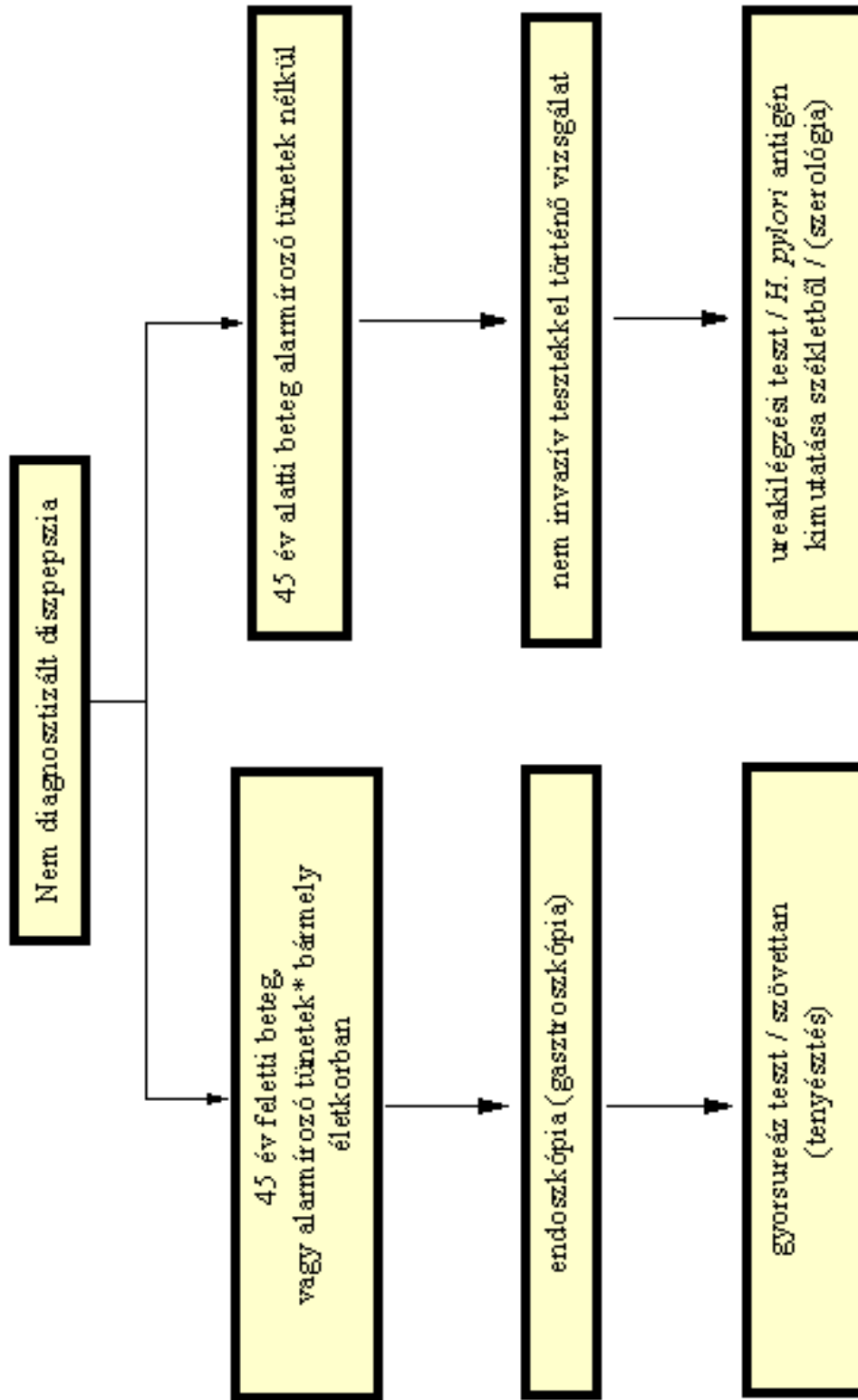
Az eradikáció eredményességének ellenőrzésére - ha ismételt endoszkópia nem szükséges - az urea kilégzési teszt, vagy a *H. pylori* antigén székletből történő kimutatása javasolt. Kétszeri sikertelen eradikáció esetén az újabb eradikációs kúra előtt - a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően - indokolt a *H. pylori* antibiotikum érzékenységének vizsgálata a kórokozó tenyésztéssel történő izolálását követően. Minthogy ma Magyarországon nagyon kevés mikrobiológiai laboratórium vállalkozik erre a feladatra, ennek a diagnosztikai összeállításnak nem titkolt célja volt az is, hogy legalább a regionális centrumokban történjen *H. pylori* tenyésztés, és antibiotikum érzékenységi vizsgálat.

*Dr. Székely Iván, Fejér Megyei Szent György Kórház Gastroenterológia Osztály

Irodalom:

1. Glupczynski Y. Culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and antimicrobial susceptibility testing. In: *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic research* 1996. Saunders, Mégraud F (eds) 17-32.
2. Buzás Gy. M. A *Helicobacter pylori*-fertőzés diagnózisa, *Helicobacter pylori* Medicina 1998, 167-195.
3. Malferheiner P, Mégraud F, O. Morain C. Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* Infection – Summary of the Maastricht-3 2005 Consensus Report. www.touchbriefings.com
4. Czirok Éva (szerk.) Klinikai és Járványügyi Bakteriológia 1999 22, 63-64.
5. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement 2006 Vol. 26. No.3 Replaces M100-S15 Vol.25. No. 1
6. De Boer W. A. *Helicobacter pylori* and dyspepsia strategies – debate: Yes – a test-and-treat strategy is a viable option in primary care. In: *Helicobacter pylori. Basic mechanism to Clinical Cure* 2002. Kluwer Academic Publishers, RH. Hunt, GNJ Tytgat (eds.), London 2003, pp. 283-295
7. A *Helicobacter pylori* fertőzés kezelésének időszerű kérdései, MGT *Helicobacter pylori* Munkacsoport. Infektológiai Útmutató 2005 Ludwig E (szerk)
8. Bodánszky H. Arató A. B. Kovács J *Helicobacter pylori* gyermekkori vonatkozásai Consensus füzetek Simon L Lonovics J (szerk) MGT – MEDICOM 2000 43-45
9. Szikra L Nagy E *Helicobacter pylori* infekciók mikrobiológiai aspektusai Consensus füzetek Simon L Lonovics J (szerk) MGT – MEDICOM 2000 23-26
10. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, et al. Rapid and fluorescent in situ hybridisation GUT 2000; 46: 608-614

A *H. pylori* fertőzés diagnosztikus algoritmus



***alarmírózó tünetek:** fogyás, anaemia, gyomorvérzés, dysphagia

Antigénkombinációk alkalmazásának jelentősége a Lyme szerológiai diagnosztikában

Kienle Zsuzsa, Boross Katalin

A Lyme betegség diagnosztikája a klinikai tünetek helyes felismerésén és értékelésén alapul, de gyakran van szükség a diagnózis laboratóriumi alátámasztására, elsősorban szerológiai módszerekkel. A laboratóriumban többlépcsős diagnosztika javasolt, az első lépésben megfelelő érzékenységgű ELISA, a másodikba megerősítő immunoblot alkalmazása. A fenti eljárás válogatott esetekben tenyésztéssel vagy nukleinsav alapú eljárással egészíthető ki.

A szerológiai diagnosztikával együtt járó ismert problémák a tesztek és az értékelés nem kellő standardizáltsága. Európában az etiológiai ágensnek – *Borrelia burgdorferi* sensu lato – jelenleg legalább három humánpatogén alfaja ismert, ezek a *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* és *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Az immundomináns antigének változatosságának magyarázata egyrészt az emberi megbetegedést okozó *Borrelia* speciestek által expresszált immunogén proteinek szekvencia-variabilitása, másrészt, az antigénexpresszió jellemző változása. Ismeretes, hogy a *B. burgdorferi* az egyes proteineket a fertőzési ciklus során változó mértékben expresszálja. Az OspA és OspC expressziója például inverz módon változik: a vérszívás a vektorban az OspC expresszióját indukálja, és az OspA termelődését szuppresszálja (Fingerle és mtsai.: 2000); ez lehet a magyarázata annak, hogy a betegség korai stádiumában jellemzően OspC elleni ellenanyagok termelődnek.

A hagyományos tesztek egyetlen törzsből származó, teljes test lizátumot tartalmaznak. Az elmúlt évtizedben megállapítást nyert, hogy európai viszonyok között, amennyiben a teszt csupán egy genospeciesből származó antigéneket tartalmaz, a legnagyobb fokú érzékenység *Borrelia afzelii* (PKo) törzs alkalmazásával érhető el. Számolni kell azonban a törzsek heterogenitásából eredő problémával, nevezetesen azzal, hogy egyetlen törzs alkalmazása esetén, elsősorban a betegség korai szakában, a teszt érzékenysége elmaradhat a kívánalmaktól, és a reaktivitás hiánya az esetek egy részében tévesen negatív eredményhez vezet. A kórkép súlyossága és a korai, megfelelő terápia alkalmazásának lehetősége ennek különös hangsúlyt ad a korai neurológiai manifesztációk esetében.

Elméleti lehetőség több, különböző specieshez tartozó törzsből előállított teszt alkalmazása, nyilvánvaló azonban, hogy a többletmunkán felül, az ezzel járó plusz költségek a finanszírozásból nem fedezhetők.

Az érzékenység növelésének további módja a tesztek kiegészítése a szenzitivitást növelő rekombináns antigénekkkel.

Rekombináns antigéneket tartalmazó / azokkal kiegészített tesztek alkalmazása megoldást kínál mind az antigén-heterogenitással, mind a változó expresszióval kapcsolatos problémákra.

A rekombináns antigének alkalmazásán alapuló tesztek a következő előnyökkel bírnak:

1. Ilyen tesztek csupán a specifikus, a diagnosztika szempontjából jelentős antigéneket tartalmaznak.
2. Az érzékenység fokozása érdekében a tesztekben különböző törzsek homológ antigénjei (OspC vagy DbpA) kombinálhatók.
3. A lizátumokkal szemben olyan, a szenzitivitás és specificitás javulását eredményező antigénekkal dúsítható, amelyek *in vitro* nem, vagy csak igen kis mennyiségben expresszálódnak.
4. Mivel az antigének kívánt mennyiségben kombinálhatók, az egyes antigének eltérő expressziója az értékelést nem befolyásolja.
5. Az antigénkombináció tetszés szerint kiegészíthető a proteinek specifikus csonkított („truncated”) darabjával (pd. p41i), vagy fúziós proteinekkel.
6. A felhasználó számára további előny, hogy az immunobloton egyéb, nem specifikus csíkok jelenléte nem zavarja a specifikus csíkok egyértelmű elkülönítését.

Következésképp, az ilyen típusú tesztek könnyebben standardizálhatók, reprodukálhatók, és egyszerűbbé teszik az egyes laboratóriumok eredményeinek összehasonlítását.

Természetesen, nem feledkezhetünk meg arról, hogy a választott tesztnek mindig a kitűzött célt kell szolgálnia. A korai fázisban, amikor az ellenanyagválasz még gyenge vagy késleltetett lehet, az antigén variabilitás és ebből következően, a reaktivitás esetleges hiánya a kapott eredményeket nagymértékben befolyásolhatja. Igen fontos ekkor, hogy a teszt a különböző törzsekből származó homológ antigének kombinációját, vagy az azok alapján előállított rekombináns antigéneket tartalmazza. A betegség késői formájában azonban – amikor a reaktivitás egyébként is számos antigén ellen irányul, és az érzékenységgel kapcsolatban kevésbé merülnek fel aggályok –, az antigén-mintázat összehasonlítása a cél, a gazdagabb, teljes antigén-spektrumot tartalmazó teszt informatívabb lehet.

VlsE

Régen fennálló igény a kombinációk helyett csupán egyetlen antigént tartalmazó teszt kifejlesztése, amely elfogadható specificitással és érzékenységgel alkalmas Lyme borreliosis szerológiai diagnosztikájában történő

alkalmazásra. Egy ilyen teszt jelentősen csökkentené a ma még számottevő előállítási költségeket, és egyszerűsítene a laboratóriumi diagnosztikát. Bár a betegség korai és késői szakában jellemzően antitestválaszt kiváltó antigének ismertek, egyelőre egyik sem felelt meg a fenti feltételeknek. A VlsE felszíni proteinre („*variable major protein-like sequence*”; VlsE) az utóbbi években irányult a figyelem. A proteint a Borreliából csak *in vivo* tenyésztést követően sikerült kivonni. A VlsE IR6 elnevezésű immundomináns régiójáról (C6) igazolták, hogy a különböző antigénvariációk által nem érintett, invariábilis szekvenciájú, emellett jó immunogén – korai, erős ellenanyagválaszt vált ki. Az immunválasz az adott genospeciéstől függetlenül kimutatható mind európai, mind amerikai betegekben. Keresztreakciót más *Borrelia* proteinekkel nem ad. Hozzáadása a hagyományosan alkalmazott antigén-kombinációhoz jelentősen növeli a tesztek érzékenységét és specificitását [Liang és mtsai.: 1999], csökkenti a tévesen pozitív és megerősítendő ELISA eredmények számát. Előnye, hogy a tesztben alkalmazott antigén alkalmas valamennyi Lyme borreliosis okozó *Borrelia* genospecies, ezen belül *B. garinii* és *B. afzelii* által okozott fertőzés detektálására.

Ma már, a fenti antigént a kereskedelemben hozzáférhető tesztek zöme tartalmazza a lizátum vagy rekombináns antigénspektrum kiegészítésére. A VlsE jellemzően IgG választ vált ki, már a fertőzés korai szakában.

A szerológiai reaktivitás betegség aktivitásával való kapcsolatára vonatkozó elegendő adat egyelőre nem áll rendelkezésre. Bár a kezelés sikerességének ellenőrzésére ma még egyetlen megbízható módszer sem áll rendelkezésre, ígéretes az a megfigyelés, amely szerint az IR6 peptid elleni antitestszint az eredményes kezelést követően szignifikánsan csökken (Philip és mtsai.: 2001).

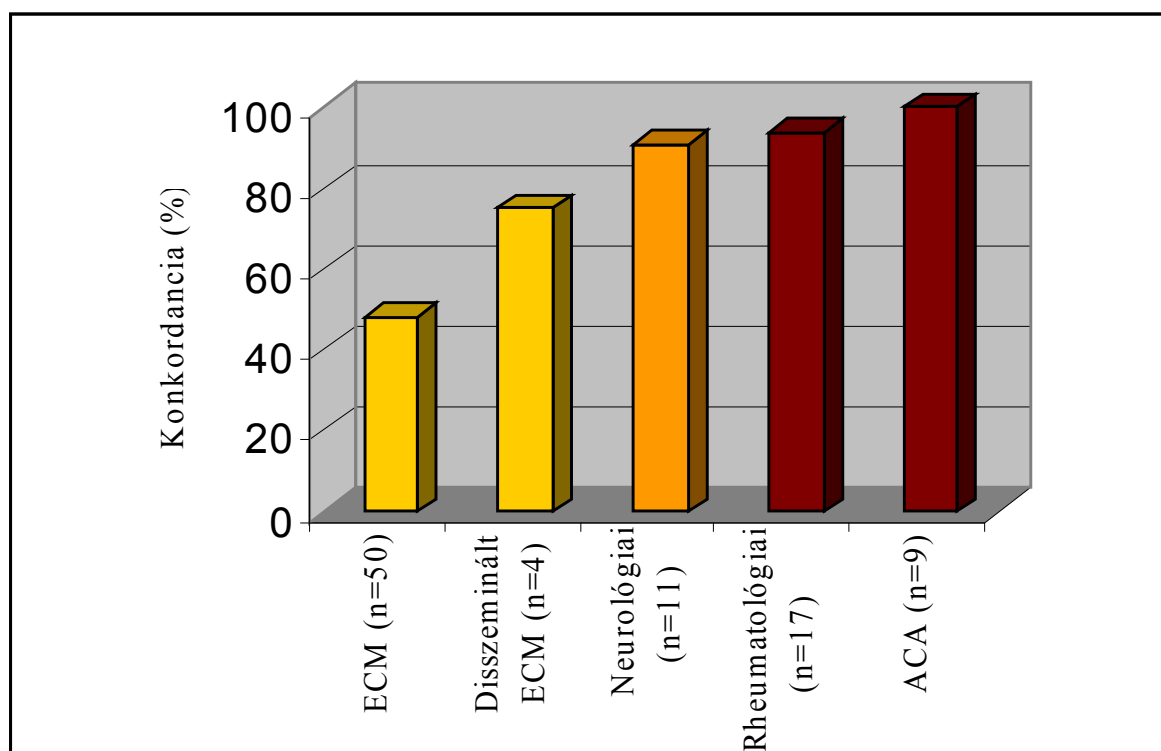
Válaszra vár a kérdés, hogy a VlsE egymagában kiválthatja-e a tesztekben az antigén-kombinációk alkalmazását. Laboratóriumunkban az IR6 antigént tartalmazó ELISA tesztet hasonlítottunk össze antigén-kombinációt VlsE antigénnel kiegészítve tartalmazó rekombináns teszttel. A teszt az IgM és IgG típusú ellenanyagok egyidejű (egy tesztben történő) kimutatására lett kifejlesztve. A teszthez a *Borrelia burgdorferi* VlsE antigénjének konzervált régiójának megfelelő szintetikus antigént kötöttek a lemezre.

A kittel klinikailag jól definiált Lyme borreliosis esetekből származó szérumokat vizsgáltunk, melyeket rekombináns antigéneket tartalmazó ELISA kittel (recomWell *Borrelia* IgG/IgM, Mikrogen) teszteltünk, és Western blottal (Virotech, Mikrogen) konfirmáltunk. A vizsgált minták közül 50 korai stádiumú lokalizált betegségből (ECM), 4 disszeminált ECM-ből, 11 neurológiai, 17 reumatológiai tünetekkel jelentkező betegektől származott. Mivel az IR6 ELISA

IgG és IgM válasz elkülönítésére nem alkalmas, első lépésben a referencia ELISA eredményét IgG- vagy IgM-reaktivitás esetében pozitívnak tekintettük.

Klinikai manifesztáció	Mintaszám (db)	Konkordancia (%) ^{*a} rekombináns IgM/IgG ELISA pozitív eredményével
ECM	50	48%
Disszeminált ECM	4	75%
Neurológiai	11	91%
Reumatológiai	17	94%
Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)	9	100%

*. Egyezés a rekombináns ELISA eredményével (IgG/IgM együttes figyelembevételével).



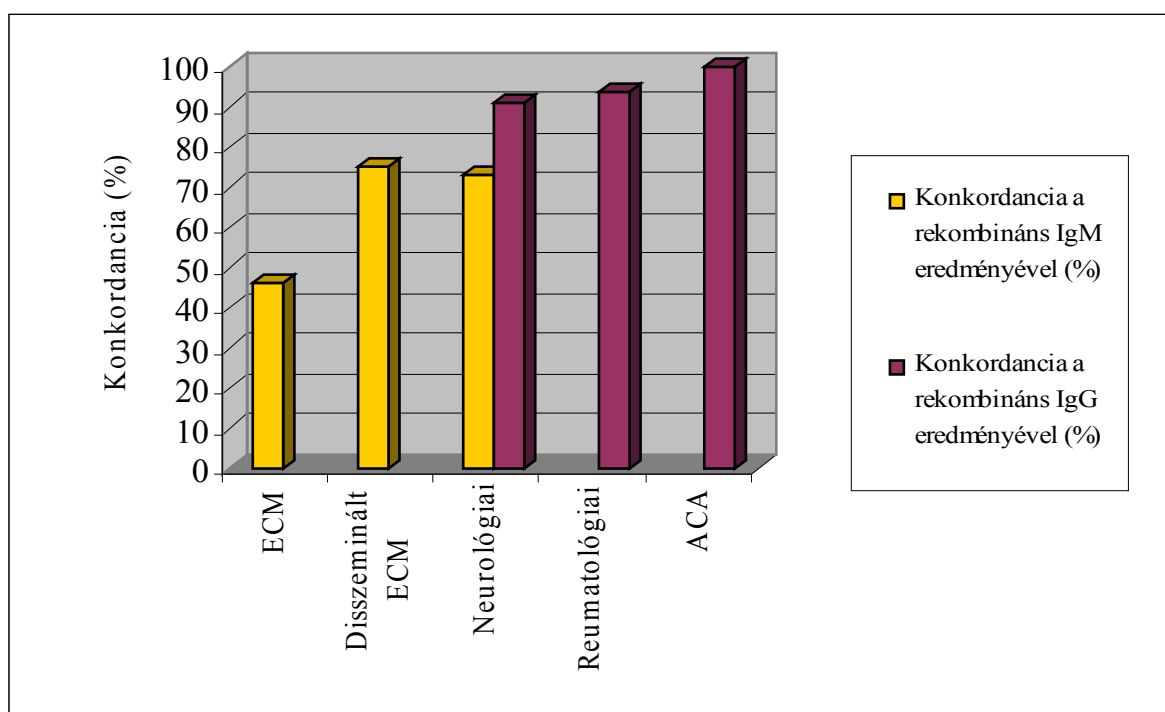
1. ábra Az IR6 ELISA és VlsE-antigénnel kiegészített rekombináns ELISA eredményeinek egyezése (%) különböző klinikai manifesztációkban

Amikor a VlsE antigénnel kiegészített rekombináns ELISA-éval nem egyező eredményeket adó szérumok Western blotjait vizsgáltuk, azt találtuk, hogy az eltérés, és az antigén-kombináció alkalmazásával megfigyelhető magasabb arányú reaktivitás szinte valamennyi esetben a rekombináns ELISA IgM

tesztben korai antigének (p41, p41i, OspC) elleni reaktivitás detektálásával volt magyarázható.

Megjegyzendő, hogy a vizsgálati szám a referencia ELISA-val negatív minták vizsgálatát nem tette lehetővé, mivel azonban az utóbbi a VlsE-antigént a kombináció részeként már tartalmazta, alacsonyabb fokú reaktivitást attól nem vártunk.

Mivel a korai esetek megítélésében az IgM, a késői esetekben az IgG reaktivitás meghatározó, a következő ábrán csak a megfelelő klinikai manifesztációra jellemző, releváns ellenanyag alosztályt vettük figyelembe.



2. ábra IR6 és rekombináns antigén-kombinációt tartalmazó ELISA eredményeinek egyezése a stádiumra releváns immunglobulin osztály figyelembevételével

Következtetések: Az egyetlen antigénként IR6-t tartalmazó kit alkalmasnak tűnik Lyme borreliosis diagnosztikájában szűrő jellegű vizsgálatok elvégzésére. A kit érzékenysége II. és III. stádiumú esetekben az antigén-kombinációt tartalmazó rekombináns teszteknek megfelel. A specificitás vizsgálatát a rendelkezésre álló tesztmennyiség nem tette lehetővé, azonban számos közlemény annak magas specificitásáról számol be. Mindazonáltal, tapasztalataink szerint, korai esetekben az antigén-kombinációt tartalmazó kit érzékenysége felülmúlja az IR6 ELISA-ét. Az egyetlen antigéne alapuló teszt

további hátránya, hogy nem alkalmas az IgM és IgG válasz külön meghatározására, és a tesztben az egyes specifikus antigénekkal (korai ill. késő) szembeni reaktivitás nem ítéhető meg. Az eredmény tehát nem ad információt a betegség stádiumainak elkülönítéséhez, és a Western blot alkalmazásának szükségességét egyelőre nem küszöböli ki.

Az eredményeket és szakirodalmi ajánlásokat figyelembe véve, elsősorban korai szakban antigén-kombinációt tartalmazó szűrőteszt alkalmazása, és a teszttel kapott pozitív eredmények megerősítése Western blottal mindenképp ajánlott.

Irodalom:

- Center of Disease Control and Prevention, Lyme Disease, *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 50, 181 (2000);
- EUCALB („European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis”) (2006);
- Fingerle V. és mtsai.: Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans, *Med Microbiol Immunol (Berlin)* 187, 121-126 (1998);
- Fingerle V. és mtsai.: Differential expression of outer surface protein A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies, *Med Microbiol Immunol*, 189, 59-66 (2000);
- Philipp M.T. és mtsai.: Antibody response to IR6, a Conserved Immunodominant Region of the VlsE Lipoprotein, Wanes Rapidly after Antibiotic Treatment of *Borrelia burgdorferi* Infection in Experimental Animals and in Humans, *J. Infect. Dis.* 184, 870-878 (2001);
- Liang FT. és mtsai.: Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *J Clin. Microbiol* 37, 3990-399 (1999).

Az ornithosis laboratóriumi diagnosztikai módszereinek fejlesztése I.

Balla Eszter, Petrovay Fruzsina

A humán ornithosis Magyarországon sporadikus (galambászok, díszmadártartók, -kereskedők, víziszárnyas-tenyésztők stb.) és járványos (baromfi-feldolgozó üzemek dolgozói) formában egyaránt előfordulhat. Jelenleg a kórkép laboratóriumi diagnosztikája elsődlegesen szerológiai módszereken alapul, és szinte teljesen háttérbe szorul a *Chlamydophila psittaci* direkt kimutatása.

Ennek oka többek között, hogy e baktérium tenyésztése nehézkes, hosszadalmas, és a viszonylag ritka humán megbetegedések kapcsán rutinszerűen nem terjedt el. Az aerosol-képződés veszélyével járó munkafolyamatok ráadásul BSL-3 szintű laboratóriumi háttérrel igényelnek. A releváns, mélyről származó légúti minta vétele is akadályokba ütközhet, mert a kórképet gyakran csak improduktív köhögés jellemzi. A diagnosztikát ugyanakkor tovább nehezíti a kórokozó nagyfokú antigén rokonsága a területen gyakori légúti kórokozónak számító *Chlamydophila pneumoniae*-vel.

A tömeges szűrésre alkalmas szerológiai vizsgálatok kiértékelésénél ugyancsak figyelembe kell venni a más chlamydia speciesekkel adott, gyakori keresztreakciókat. A specifikus IgA, IgG és IgM detektálására jelenleg egyedül a micro-immunfluorescens (MIF) technika (Focus) képes¹. (CDC referencia standard) Valamennyi szerológiai eljáráshoz hasonlóan ennek is az a hátránya, hogy a betegétől származó első minta, különösen, ha a tünetek kialakulása és a mintavétel között rövid idő telt el (kevesebb, mint nyolc-tíz nap), még alkalmatlan lehet a szerológiai diagnózis megállapítására; az ornithosis gyanújának felvetésére. Ilyen korai mintánál csak ritkán fordul elő, hogy markáns *C. psittaci* ellenanyagválaszt detektálunk, annál gyakoribb, hogy *C. pneumoniae* specifikus antitestek erős pozitívását észleljük. Ezt az általános következtetést a hazai ornithosis járványok szerológiai vizsgálatai során vonhattuk le. Ennek okát a korai szakaszban megítélni még nem lehet; ezért a feltételezhetően *C. psittaci* okozta járványok kezdetén gyakran csak genus szinten tudjuk felvetni a chlamydia eredetű fertőzés gyanúját.

A korai laboratóriumi diagnózis jelentősége ugyanakkor felbecsülhetetlen, hiszen az ornithosis kezeletlen, súlyos eseteiben a halálozási arány a 20 százalékot is megközelítheti².

A járványügyi jelentőséggel is bíró megbetegedések a *Chlamydophila psittaci* molekuláris diagnosztikájának (PCR) bevezetését sürgették, mivel a gyors, species-szintű differenciál-diagnosztika céljára ez a módszer a legalkalmasabb.

Az eljárás kidolgozása a 2005. decemberében a békéscsabai járvány során fulmináns lefolyású, ornithosis gyanús megbetegedésben elhunyt beteg

boncolási anyagának feldolgozásán alapult. Irodalmi összefoglalók tanúsága^{2, 3} szerint az időben kezdett, megfelelő antibiotikum-terápia (doxycyclin vagy makrolid-származék) mellett igen ritkák a fatális szövődmények. Az elhunynál azonban hosszas és hatástalan béta-laktám terápia előzte meg a hospitalizációt, és a klinikai diagnózishoz szükséges mintavételre már csak az intenzív osztályon, a halál beállta előtti napokban került sor. (Megjegyzendő, hogy a beteg az intenzív ellátás keretében ciprofloxacín terápiában részesült, melynek súlyos esetben már leírták a hatástalanságát⁴.)

Fentiek alapján a szérumminta emelkedett *C. psittaci* ellenanyag-szintjei (IgA 1:64 pozitív; IgG 1:512 pozitív; IgM 1:16 kétes) a prognózis szempontjából sajnos már későn valószínűsítették a kórkép etiológiáját. A tüdőszövetből származó kórbonctani anyagból a 2006. évben beállításra került, *C. psittaci* DNS kimutatásán alapuló molekuláris PCR módszerrel igazolni tudtuk a *C. psittaci* jelenlétét. Differenciál-diagnosztikai és járványügyi szempontból döntő volt, hogy a nested PCR technika segítségével ki lehetett zárni a *C. pneumoniae* fertőzés lehetőségét.

2007. január 30-án a Jász-Nagykun-Szolnok megyei Hetényi Géza Kórházban kezelt pneumóniás beteg szérummintájából laboratóriumunk az ornithosis gyanúját valószínűsítette (IgA: 1:128 pozitív; IgG 1:512 pozitív; IgM 1:16 kétes). A libatelepen dolgozó beteg légúti tünetei egy hónappal korábban kezdődtek. Minden bizonnyal a kezdeti (hatástalan) Augmentin terápia is hozzájárult az elhúzódó pneumonia kialakulásához. A kórház utólag, laboratóriumunk kérésére köpetmintát is küldött, amelyből *C. psittaci* PCR-rel igazolható volt a kórokozó DNS-ének jelenléte. Ez volt az első eset, hogy a kidolgozott *C. psittaci* PCR eredménye a klinikai diagnosztika terén nyert gyakorlati jelentőséget. (A beteg a kórházból gyógyultán távozott.)

Laboratóriumunk 2007. március 8-án és 9-én a kalocsai kórház intenzív osztályán egy lélegeztetett, két hete lázas betegtől származó szérumot, ill. bronchusváladékot vizsgált ornithosis irányában. A baromfifeldolgozóban korábban kopasztóként (aerosol-expozíció fokozott veszélye!) dolgozó betegnél felmerülő szerológiai gyanút (IgA 1:32 pozitív; IgG 1:256 pozitív; IgM 1:16 negatív) a bronchusminta pozitív *C. psittaci* PCR eredménye erősítette meg. A korábbi Rocephin-Dalacin-Avelox antibiotikum kombinációt a laboratóriumi eredmény közlése után makrolid adásával egészítették ki. A több szervet érintő károsodás következtében a beteg napokon belül elhunyt. Boncolási anyagának feldolgozása, ill. további beteg alkalmazottak szűrővizsgálata és az eredmények értékelése folyamatban van.

Az ornithosis humán előfordulása, ill. a fatális szövődményekbe torkolló, súlyos megbetegedések megelőzhetőek lennének:

- a veszélyeztetett munkahelyeken megfelelő higiénés óvintézkedések foganatosításával;

- a dolgozók egészségügyi felvilágosításával (a banális légúti tüneteket sem szabad elhanyagolniuk);
- az alapellátásban dolgozó orvosok; ill. elsősorban a pulmonológusok bevonásával, akik a részletes anamnesztikus adatok alapján elsőként vethetik fel az ornithosis gyanúját. A laboratóriumi kivizsgálást és a helyes terápiát is ők indikálhatják.

Fentiek tükrében javasoljuk, hogy a beküldő orvos az ornithosis-gyanús betegeknek a laboratóriumi vizsgálatra szánt első szérummintát feltétlenül egészítse ki egy **alsó légúti** mintával (járóbetegnél steril tartályba ürített köpettel; lélegeztetett betegnél bronchoszkópos váladékkal). Az akut *C. psittaci* megbetegedések korai fázisában a gyakran még negatív szérumminta és a várhatóan pozitív, releváns alsó légúti minta párhuzamos vizsgálata gyors és korrekt diagnózist nyújthat, melynek jelentősége nem csak terápiás, de járványügyi szempontból sem lebecsülendő.

A jelenleg használatos labordiagnosztikai módszerek értékelése, az eredmények interpretálása és az irodalmi összeállítás egy újabb, folytatólagos közlemény tárgyát képezi.

Javasolt mintavételi protokoll

1.) Szükséges szérumminták:

A) a fertőzés korai szakaszában, lehetőleg az **antibiotikum-kezelés megkezdése** előtt levett szérumminta; melyhez feltétlenül mellékelni kell a tünetek jelentkezésének, ill. a mintavétel időpontját; valamint az antibiotikum terápia részleteit.

B) a betegség convalescens szakában, **minimum 3 héttel később** levett szérumminta.

C) esetenként szükség lehet 3. vérminta vizsgálatára, amennyiben az antibiotikum kezelés késlelteti az ellenanyagszintek változását. Ezt a laboratórium a beküldővel történő konzultáció során kérheti.

2.) **Direkt kórokozó-kimutatást (PCR)** elsősorban a friss esetekben célszerű végezni (lehetőség szerint még az antibiotikum kezelés előtt, de ez önmagában nem kontraindikáció)! Ehhez **steril, transzportmentes tartályba** vett; felső légúti, kontaminációtól (nyál) mentes, alsó légúti (köpet, bronchoalveoláris lavage, védett kefével vett) minta szükséges. A mintát 24 órán belül, hűtve (nem fagyasztva) kell az OEK-be szállítani. Fagyasztás csak a 24 óránál tovább tárolt minták esetében javasolt.

A bakteriológiai körkísérlet (KK 2006/II.) értékelése

Gacs Mária

A körvizsgálatokban való részvétel a laboratóriumok számára, egy nagyon lényeges szakmai kontrollt jelent.

A körvizsgálatoknak külső minőségi kontrollként csak az lehet a célja, hogy a szakmai fejlődést, fejlesztést szolgálja. A résztvevők a hibákból, hiányosságokból tanuljanak, szükségesnek érezzék, hogy folyamatosan képezzék magukat, s ennek eredményeként helyesen interpretálják eredményeiket, konzultáljanak, s adjanak hasznos tanácsokat a klinikusnak az antibiotikum terápia vonatkozásában.

A laboratórium teljesítményének értékelése - az egyes tesztkészítmények eredményei alapján - minél alaposabb és részletesebb, annál többet fog segíteni az esetlegesen felmerülő hibák kijavításában, s abban, hogy munkáját szakmailag még jobban még eredményesebben tudja végezni. Nem szolgálja az utóbbi célt, ha megoldandó feladatok túl egyszerűek, könnyűek, nem feladat az eredmény interpretálása, s a laboratórium számára nem nyújt többet csak a körvizsgálatban való részvétel igazolását.

Az értékelések nemcsak az egyes laboratóriumoknak segítenek felszámolni hibáikat, de a szakmai vezetésnek is fontos információt nyújtanak. A bemutatott általánosan előforduló kisebb-nagyobb hibák, s a ritkább, de súlyos, a szakmai ismeretek hiányosságát jelző teljesítmények is támpontot adnak a képzések továbbképzések összeállításában, s a mikrobiológiai laboratóriumok szakmai színvonalának megítélésében.

A körvizsgálatok értékelésekor a résztvevő laboratóriumoknak megküldött egyedi értékeléseken túl szükségesnek látszik a laboratóriumok összesített teljesítményének bemutatása is, egyrészt, hogy a laboratóriumok saját eredményeiket összevethessék másokéval, másrészt tudatosuljon hol és mennyiben térnek el a referens laboratóriumi eredményektől.

Az alábbiakban a 2006/II. körvizsgálat összesített bakteriológiai eredményeit kívánom értékelni, előrebocsátva, hogy az egyedi részletes értékeléseket már a többi mikrobiológiai eredménnyel együtt kézhez kapták a laboratóriumok.

A körvizsgálat eredményeinek értékelése tesztkészítmények szerint:

A tesztkészítmény jele: KK 2006. II/1.

A minta megnevezése: aerob, anaerob haemokultura

A beteg kora, neme: 5 éves fiú

Anamnézis: felső légúti infekció

A beteg klinikai tünetei: dyspnoe, tachycardia, magas láz, elesettség

Megelőző antibiotikum terápia: clarithromycin

Eredmény: aerob tenyésztéssel

- *Streptococcus pneumoniae*
- α -haemolizáló *Streptococcus*
anaerob baktérium nem tenyésztett ki

A tenyésztési eredmény interpretálása:

A klinikussal való konzultáció szükséges! Az anamnézisben szereplő tünetek alapján kitenyésztett *Streptococcus pneumoniae* törzs kórokozónak tekinthető, míg a mellette izolált α - haemolizáló *Streptococcus* feltehetően kontamináció. A konzultáció és az ismételt haemokultura vizsgálat megerősítheti a diagnózist.

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredményének interpretálása:

Az alacsony szinten rezisztens *S. pneumoniae* okozta invazív infekciók terápiájában, elsősorban a 3. gen. cefalosporinok javasolhatók, így ebben az esetben is, de szükség esetén más β -laktám antibiotikumok adása is szóba kerülhet (nagy dózisú penicillin, imipenem)

Szükségesnek ítéli-e elküldeni az izolátumot referens laboratóriumba további, vagy megerősítő vizsgálat céljából?

A haemokulturából kitenyésztett *S. pneumoniae* törzset szükséges referens laboratóriumba küldeni az OEK Bakteriológia I. osztálya által kiadott kísérőlappal további (szerológiai) vizsgálat és a nemzetközi surveillance adatszolgáltatás céljából.

Értékelés

Tenyésztés, identifikálás

A résztvevő laboratóriumok mindegyike kitenyésztette és jól identifikálta a tesztkészítményben szereplő *S. pneumoniae*-t, (egy laboratóriumba törötten érkezett a liofilizált ampulla, így nem dolgozták fel). A „valószínű kontamináns”-ként megítélendő α - haemolizáló *Streptococcus*-t 5 laboratórium egységesnek ítélve a tenyészetet, nem izolálta.

A laboratóriumok többféle eljárást alkalmaztak a baktériumok identifikálására.

Az identifikálás módja:

Mód	Laboratóriumok száma
Hagyományos	11
Kereskedelmim identifikáló kit	6
Automata	2

A laboratóriumok nagy része a *Streptococcus pneumoniae* identifikálását megerősítő kiegészítő vizsgálatot is végzett. A hagyományos vizsgálatot 6-an antigén kimutatással és/vagy kereskedelmi identifikáló kittel erősítették meg, és csak 5 laboratórium volt, ahol egyféle diagnosztikus eljárást alkalmaztak.

A hagyományos módon végzett vizsgálatok során a telep és mikroszkópos morfológia, és epeoldás mellett az optochin érzékenység vizsgálata elengedhetetlen. Az optochin vizsgálatról szinte minden laboratórium beszámolt, egyetlen laboratórium volt, ahol csak az epeoldás pozitív eredményére alapozták a diagnózist. A zöldítő *Streptococcus* identifikálásával kevesen foglalkoztak, de ez ebben az esetben nem is volt szükséges.

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

A laboratóriumok közül csak 5 (270, 272, 279, 274, 280) vizsgálata felelt meg az alábbiaknak

- a CLSI előírásai szerint antibiotikum érzékenységi vizsgálatot végzett,
- az eredménye megfelelt a referens laboratórium eredményének
- a kapott eredményt helyesen értékelte

A penicillin és 3. gen. cefalosporinok érzékenységi vizsgálatának összesített eredménye az alábbiakban látható:

Streptococcus pneumoniae penicillin érzékenységi vizsgálata

penicillin MIC érték	0,125*	0,75	1	1,5	2	3	4	nem határozta meg a MIC értéket
laboratóriumok száma	1	1	1	1	8	2	1	4 (ezek közül 3 az 1 µg oxacillin alapján R-ként interpretálta)
az eredmény értékelése	M	M	M	M*	R	R	R	

Streptococcus pneumoniae 3. gen. cefalosporinok érzékenységi vizsgálata

Ceftriaxon / cefotaxim MIC érték	0,094*	0,5	0,75	1	1,5	2	korongdiffúzióval határozta meg	nem határozta meg
laboratóriumok száma	1	3	2	2	3	2	3*	3 (2 OEK-be küldi)*
az eredmény értékelése	S	S	S1, M1*	S1, M1*	M2, R1*	M1, R1*	?	-

* kifogásolható eredmények és értékelések

Az előforduló súlyos hibák:

- a penicillin MIC értékét nem határozta meg (nem használt penicillin Etest-t)
- nem vizsgált 3. gen. cefalosporin érzékenységet
- a 3. gen. cefalosporinok MIC értékét rosszul értékelte
- a 3. gen. cefalosporinokat, s egyéb béta-laktámokat korongdiffúzióval vizsgálta és értékelte (CLSI nem ad meg ezen antibiotikumoknál korongdiffúziós határértékeket!)

Invazív infekcióból származó *S. pneumoniae* esetén a penicillin mellett a terápiában szóba jöhető antibiotikumok elsősorban a 3. gen. cefalosporinok MIC meghatározása szükséges, a lehető legrövidebb időn belül.

MIC meghatározást 15-en végeztek, 14-en Etest-el, 1 laboratórium ATB-vel.

A penicillin MIC értékét 4 laboratóriumban nem határozták meg. Egy laboratórium nem adott meg penicillin érzékenységi eredményt, 3-an az oxacillin korongdiffúziós eredmény alapján rezisztensnek közölték.

Egy laboratórium nem vizsgált 3. gen. cefalosporin érzékenységet, s semmi más antibiotikumot sem, ami a terápiában szóba jöhetne. Etest hiányában 2 laboratórium az izolátumot referens laboratóriumba küldené. (Ez nem lehet megoldás, egy klinikai esetben a lehető leggyorsabb eredmény fogadható csak el.)

Különböző Etest-ek alkalmazásának gyakorisága *S. pneumoniae* esetében laboratóriumonként:

Vizsgált antibiotikum:						
összes	4 vagy több	P	P+CTX/CRO	AMX+CRO	P+CRO+MEM	P+Va
2	5	1	3	1	1	1

A KK 2006. II/1 tesztkészítmény eredményét összegezve az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok esetében sokkal több, súlyosabb hiba és hiányosság volt, mint a tenyésztés és identifikálás területén. Mivel a beteg és a klinikus számára is a rezisztencia vizsgálata a legfontosabb, és a laboratórium szakmai színvonala tekintetében is meghatározó, szükséges további erőfeszítéseket tenni a rutin antibiotikum érzékenységi vizsgálatok hitelességének növelésére. A laboratóriumokban folyó tevékenységek közt az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok akkreditációja megoldást nyújthat erre a problémára.

Interpretáció

A tenyésztési és identifikálási eredményhez 3 laboratórium nem fűzött semmiféle megjegyzést. A *Streptococcus pneumoniae* eredményt laboratóriumok

többsége általában jól interpretálta, néhány laboratórium kitűnően, míg 4 nagyon szűkszavúan, nem megfelelően.

A kontamináló α -haemolizáló *Streptococcus* tenyészetben való jelenlétét a laboratóriumok többsége helyesen ítélte meg, de a klinikussal való közlés tekintetében nagyon változóan jártak el.

Nagy valószínűséggel kontaminációként értékelték négyen, ebből ketten kiadják, ketten nem, az utóbbi kettő konzultál, és ismétlést kér. Nem zárta ki kórokozó szerepét, kiadja antibiotikum érzékenységi vizsgálati eredménnyel 8 laboratórium. Ezek közül megítélését a konzultáció során a részletesen megismert klinikai tünetektől teszi függővé 3, ismételt vizsgálatot kér ugyancsak 3 laboratórium. Ketten nem interpretálják, egyikük kiadja, a másik nem.

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat interpretációja területén még nagyobb a bizonytalanság. Több laboratórium a terápiára vonatkozóan semmiféle javaslatot nem tesz, mások az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredményére utalnak. (Ebben az esetben - amikor a penicillin kivételével minden antibiotikumra érzékeny a törzs, és a laboratóriumok többsége többet vizsgál és közöl a szükségesnél - ez nem elegendő a konzultációhoz.) Helytelen terápiás javaslatot közölt 5, két laboratórium a nem megfelelő eredmény miatt interpretálta helytelenül, bár az eredménynek megfelelően. **A 20 résztvevő laboratóriumból kettő interpretálta hibátlanul, s adott megfelelő terápiás javaslatot.**

A tesztkézítmény jele: KK. 2006. II/2

A minta megnevezése: punktátum

A beteg kora, neme: 32 éves nő

Anamnézis: méhen kívüli terhesség

A beteg klinikai tünetei: nőgyógyászati műtétet követően láz, hasi érzékenység, fájdalom

Megelőző antibiotikum terápia: műtét alatti profilaxis: cefamandol

Eredmény:

Aerob tenyésztéssel:

- **methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA)**
- **vancomycin mérsékelten érzékeny *Staphylococcus aureus* (VISA) gyanú**

Anaerob tenyésztéssel:

- ***Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bacteroides fragilis* csoport)**

A tenyésztési eredmény interpretációja:

Az aerob baktérium nosocomialis infekció kórokozójának tekinthető, míg a vele együtt kitenyésztett anaerob baktérium feltehetőleg endogén eredetű,

ebben az esetben egymás kórokozó szerepét segítve, a műtét során legyengült állapotú betegben kialakíthatták a kóros folyamatot

Az MRSA és a VISA gyanús törzs miatt az eset jelentendő a kórházhygiénikus és az illetékes epidemiológiai szolgálat felé.

Az antibiotikum érzékenységi eredmény interpretációja:

A methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* szokásos vancomycin terápiája, ebben az esetben kevés eredménnyel kecsegtet, mivel a vancomycinnel szemben emelkedett MIC értékű volt az izolált törzs. A rifampicinnel való kombináció mindenképpen indokolt. Javasolható még a linezolid, vagy quinupristin/dalfopristin és irodalmi adatok szerint a daptomycin és a tigecyclin is.

A *S. aureus* törzs referens laboratóriumba küldendő az emelkedett vancomycin MIC érték miatt, amennyiben az adott osztályon több MRSA fordul elő a törzsek tipizálása is szükséges.

Értékelés

Tenyésztés és identifikálás

Mindkét kórokozót kitenyésztette és jól identifikálta a laboratóriumok 60 %-a (12).

Az aerob kórokozót, a *Staphylococcus aureus*-t minden laboratórium kitenyésztette és jól identifikálta.

Az anaerob baktériumot 16 laboratórium izolálta, bár a vizsgálati anyagot mindenki feldolgozta anaerob módon is, négy laboratóriumban nem tenyésztették ki a *B. thetaiotaomicron*-t. A tesztkészítménybe tett anaerob baktérium nem tartozik a nehezen izolálható, különleges tápigényű törzsek közé, így egy rutin diagnosztikát folytató bakteriológiai laboratóriumnak minden nehézség nélkül ki kellett volna tenyésztenie. A *B. thetaiotaomicron* telepei jól elkülöníthetők voltak a *S. aureus* telepektől, de a folyékony táptalajban a gáztermelődés jele és a mikroszkópos vizsgálat is felhívhatta a figyelmet, további baktérium jelenlétére.

Tehát eredményként elfogadhatatlan, és súlyos hiányosságokra utal, amennyiben a laboratórium az anaerob baktériumot nem tenyésztette ki.

Az anaerob identifikálás módja.

A diagnosztikus célból összeállított antibiotikum tartalmú korongsort, szinte mindegyik laboratórium használta, ezen kívül az identifikálásban a hagyományos biokémiai reakciók eredményére csak egy laboratórium támaszkodott. Különböző kereskedelmi tesztet használt 14 laboratórium, (API 20A (hat), API Rapid ID32 (három), Crystal (három), Remel ANA (kettő), egy laboratórium nem közölte az identifikálás módját. Az identifikálási eredmények

össességében jónak mondhatók. Species szintig helyesen határozták meg 9, csak genus szintig identifikálták jól 7 laboratóriumban.

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat:

Örömmel állapítható meg, hogy a methicillin rezisztenciát mindenki felismerte, s csaknem kivétel nélkül jól interpretálta. Nagyon sok esetben helyes volt a rezisztencia mechanizmus meghatározása is. Úgy gondolom a körvizsgálatok és a körlevelek írásai is sokat tettek azért, hogy ezen a téren már alig tapasztalhatók hiányosságok. Az 1µg-os oxacillin mellett vagy helyett, a 30 µg-os cefoxitin korongot többen használták, de alkalmazása még nem vált általános gyakorlattá. A rezisztenciáért felelős *mecA* gén-t ketten határozták meg, a laboratóriumok többsége (19-ből 17) a rezisztencia gén hatására kialakuló PBP2a kimutatásával erősítette meg az MRSA diagnózist.

A vancomycin érzékenység vizsgálatára 12 laboratóriumban történt MIC meghatározás, ebből 9 esetben Etest, 2 esetben VITEK, 1 esetben MICRONAUT alkalmazásával. Heterorezisztencia esetén az automata rendszerekkel való vizsgálat eredménye gyakran nem megbízható. Csak korongdiffúziós vizsgálat történt 8 laboratóriumban, annak ellenére, hogy a glikopeptidok érzékenysége megbízhatóan nem határozható meg korongdiffúzióval sem az enterococcusok, sem a staphylococcusok esetében.

A vancomycin MIC vizsgálat eredménye:

MIC érték µg/ml:	0,25*	2	2,5*	4	6	8
Laboratóriumok száma:	5	2	1	5	1	2
Interpretálás:	S	S	S*	S*	VISA	VISA
		(VITEK)		1 VISA		

* kifogásolható eredmények és értékelések

A laboratóriumok által közöltek azt mutatják, hogy még közel sem általánosan használt a vancomycin screen lemez, a VISA/GISA törzsek esetleges előfordulásának felismerésére. Két laboratórium számolt be a screen lemez alkalmazásáról, egy laboratórium volt, ahol a screen lemezen való növekedés alapján indított Etest vizsgálat valószínűsítette a VISA diagnózist (274). Ezen kívül hárman az Etest vizsgálat eredménye alapján gondoltak VISA törzsrre, s ennek megerősítésére szükségesnek tartották referens laboratóriumba küldeni a törzset (270, 273, 279). Négy olyan laboratórium volt, ahol a 4 µg-os vancomycin MIC érték kiváló eredmény volt, azonban még a CLSI (2005) korábbi határértékeit vették figyelembe, s így érzékenyként interpretálták. Kár, hogy nem vették figyelembe a CLSI/2005 megjegyzés rovatában és a Mikrobiológiai Körlevél 2005/1. számában leírtakat, nem vetették fel VISA

gyanúját, s emiatt nem szándékoztak a törzset további vizsgálatra, referens laboratóriumba küldeni.

A 2006. évi CLSI M100-S16 szerint a S. aureus vancomycin érzékenységi breakpointja 2 µg/ml, így a 4 µg/ml már mérsékelten érzékenységet jelöl. A screen lemezt célszerű 4 µg/ml vancomycinnel készíteni, (a CLSI ajánlása 6 µg/ml) vagy az EARSS legújabb ajánlását használni (lásd a körlevél végén a „Szakmai észrevételek, javaslatok” rovatban) és azt a törzset, amely a screen lemezen növekedést mutat, szükséges populáció analysis vizsgálatra referens laboratóriumba küldeni.

A 16 anaerob baktériumot izoláló laboratóriumból 12-ben végezték el a törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatát. A laboratóriumok többsége az antibiotikumok MIC értékének meghatározására Etest-t alkalmazott, hárman ATB ANA automata MIC meghatározást közöltek. Hárman csak ajánlást adtak, egy laboratórium nem végzett antibiotikum érzékenységi vizsgálatot.

Eredmények:

Antibiotikum µg/ml	metronidazol	amoxicillin/ klavulánsav	imipenem	clindamycin	cefoxitin
1.	1	1	0,125	4	32
2.	0,5	3	32	2	-
3.	0,5	0,38	0,19	2	-
4.	1	0,25	0,094	2	16
5.	< 8	< 4/2	< 4	< 2	< 16
6.	< 8	< 4/2	< 4	< 2	< 16
7.	3	0,75	-	-	-
8.	0,5	0,75	0,125	-	-
9.	0,38	-	-	-	24
10.	1,5	1,5	-	1,5	-
11.	1,5	0,75	0,5	-	-

A MIC eredményeket összegezve: az anaerob baktériumok antibiotikum érzékenységi vizsgálatait területén a korábbi évekhez viszonyítva, a résztvevő laboratóriumok eredményei alapján pozitív irányú változás tapasztalható. A MIC meghatározás szélesebb körű, a terápiában szóba jöhető antibiotikumok érzékenységének vizsgálatára általánosabbá vált az Etest használata. Az értékek pedig, egy-két kirívó esettől eltekintve kevésbé szórnak.

A tesztkészítmény jele: KK. 2006. II/3

A minta megnevezése: trachea váladék

A beteg kora neme: 66 éves férfi

Anamnézis: közlekedési baleset

A klinikai tünetek: polytraumatizált, lélegeztetett beteg

Megelőző antibiotikum terápia: ciprofloxacín, ceftazidim

Eredmény: *Acinetobacter baumannii*

Interpretáció: multirezisztens, nozocomiális baktérium. A klinikussal konzultálni kell, miután a kísérőlapon infekcióra utaló tünetek nem szerepelnek, kórokozó szerepe nem ítéhető meg. Amennyiben infekció áll fenn releváns minta (endotracheális aspirátum, BAL, PSB) beküldését kérjük. Az értékelést segíti a köpet esetében szokásos citológiai vizsgálat, s amennyiben feldolgozzuk a mintát, a kitenyészett baktérium csiraszámának meghatározása.

A törzset, multirezisztenciája miatt jelenteni kell és amennyiben az adott osztályról több esetben kitenyészthető epidemiológiai tipizálás céljából az OEK Fág és molekuláris tipizáló osztályára szükséges küldeni.

Infekció esetén a terápiás javaslat: ampicillin/sulbactam, vagy carbapenem.

Értékelés

Tenyésztés, identifikálás:

A baktériumot minden laboratórium kitenyészttette. A species nevét ketten írták helytelenül, hárman a genus nevét csak rövidítéssel adták meg. Az eredményben a baktérium teljes neve kiírandó.

Identifikálás: genus szintig a baktériumot mindenki jól határozta meg. Helyes eredmény az „*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* komplex” mivel pontos identifikálás csak molekulárisan lehetséges, a mindennapi gyakorlatban azonban az *Acinetobacter baumannii* megnevezés ugyancsak helytálló.

A meghatározás módja:

- csak hagyományos: 6
- hagyományos + kereskedelmi kit: 8
- csak kereskedelmi kit: 3
- Automata (VITEK): 3

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

Teljesen hibátlan eredmény nem volt. Csak kis hibák fordultak elő 8 laboratórium eredményében. Leggyakrabban az amikacin és cefepim eredményben volt eltérés, amennyiben mérsékelten érzékeny helyett

rezisztensnek találták. A kis eltérések mellett súlyos hibák is voltak 7 laboratórium esetében. A piperacillin/tazobactam 4 esetben volt érzékeny a referens laboratórium rezisztens eredménye helyett. Súlyos hibának értékelhető az is, hogy 3 laboratórium nem vizsgálta az ampicillin/sulbactam érzékenységet. A részletes eredmények az alábbi táblázatban láthatók:

antibiotikum	Referens labor eredménye		MIC értéket közlő laborok száma			Korongdiffúziós eredményt közlő laborok száma		
	MIC (µg/ml)	disc (mm)	É	M	R	É	M	R
amikacin	32 M	16 M	1	-	-	1	1	13
ampicillin/sulbactam	8 É	24 É	3	-	-	13	1	-
cefepim	16 M	16 M	1	2	-	1	-	12
cefotaxim	64 R	6 R	-	-	-	-	-	6
ceftazidim	64 R	11 R	-	2	2	-	-	16
ceftriaxon	64 R	6 R	-	-	2	-	-	3
ciprofloxacin	8 R	14 R	1	-	3	1	3	16
gentamicin	32 R	6 R	-	-	3	-	-	15
imipenem	1 É	25 É	4	-	-	16	-	-
meropenem	2 É	21 É	3	-	-	15	-	-
piperacillin/tazobactam	128 R	17 R	1	-	2	3	6	7
tetracyclin	32 R	9 R	-	-	-	-	-	5
tobramycin	32 R	6 R	-	1	3	-	1	14
Trimethoprim / sulfamethoxazol	8 R	6 R	-	-	2	-	-	13

Interpretáció:

A laboratóriumok fele helyesen ítélte meg a kitenyésztett baktériumot. Multirezisztens, nozokomiális patogén, járványügyi osztálynak, kórházhygiénikusnak jelentendő, ez volt az általános vélemény és megjegyzés. Többen felvetették, hogy nagyon valószínű a kolonizáció, de szükséges a konzultálni a klinikussal, s fontosnak tartották infekció esetén releváns minta beküldésének kérését. A legjobb interpretációt a 273, 279-es kóddal jelölt laboratóriumok küldték.

Szakmai észrevételek, javaslatok:

Hibák az antibiotikum érzékenységi vizsgálati eredményekben a bakteriológiai surveillance adatok és a 2006/II. körvizsgálat eredményei alapján:

Escherichia coli

Durva hibák:

- ampicillin=R piperacillin=S
- ceftazidim vagy ceftriaxon=R 2. és/vagy -3. gen. cefalosporin =S

Észrevételek:

- több laboratórium nem vizsgálja a cefotaxim érzékenységet, helyette a ceftazidim mellett ceftriaxon érzékenységet ad meg, mely az EARSS és a CLSI ajánlása alapján is megfelelő. Azonban a kromozómális béta-laktamáz túltermelő *Klebsiella oxytoca* törzsek általában ceftaxionnal szemben rezisztensek, míg a cefotaximmal szemben nem. Mivel ez a *K. oxytoca* törzseknél befolyásolja az ESBL-termelés fenotípusos felismerését, ezért ajánljuk -lehetőség szerint- a rutin diagnosztikában a cefotaxim érzékenység vizsgálatát.

Streptococcus pneumoniae

Durva hibák:

- 1µg os oxacillin <20mm=penicillin R (penicillin MIC érték hiánya)
- 3. gen. cefalosporin vizsgálatának hiánya invazív esetekben
- 3. gen. cefalosporinok MIC értékeinek nem megfelelő interpretációja (az izolátum származási helyétől függő értékelés hiánya)

Staphylococcus aureus

Javaslat:

- az EARSS ajánlása szerint a VISA (GISA) törzsek felismerésére 5µg/ml teicoplanin tartalmú screen lemez*
- a ≥4µg/ml vancomycin MIC értékű törzsek referens laboratóriumba küldése

*EARSS ajánlása VISA/VRSA törzsek detektálására

VISA/VRSA screen:

- táptalaj: 5 µg/ml teicoplanint tartalmazó Mueller-Hinton táptalaj
- alkalmazott baktérium tenyészet: egy éjszakán át BHI levesben növesztett törzs
- kivitelezése: 10 µl baktériumtenyészet cseppentése a táptalajra. 35 °C-on 48 h inkubálás után kell értékelni a növekedést.

Növekedés: VISA/VRSA gyanús törzs, ekkor az alábbiakban részletezett **Etest** vizsgálat szükséges

Nincs növekedés: VSSA törzs (a jelenlegi ajánlás szerint)

- kontroll törzsek (**Nemzeti MRSA Referencia Labor ajánlása**):

Pozitív kontroll: ATCC 700698 (Mu3) és/vagy ATCC 700699 (Mu50)

Negatív kontroll: ATCC 29213

VISA/VRSA gyanús törzsek Etest: vizsgálata

- táptalaj: BHI 90mm átmérőjű Petri csészében

- alkalmazott baktérium tenyészet: BHI levesben beállított, 2 McFarland sűrűségű baktérium szuszpenzió

- kivitelezése: 200 µl baktérium szuszpenzió BHI lemezre történő kikenése. vancomycin és teicoplanin Etest felhelyezése a táptalajra a gyártó előírása szerint. 35°C-on 48 h inkubáció után értékeljük.

- Értékelés:

Pozitív az eredmény, ha

i, a teicoplanin ≥ 12 µg/ml **VAGY**

ii, a teicoplanin ≥ 8 µg/ml **ÉS** vancomycin ≥ 8 µg/ml

Ezek az értékek nem interpretálhatók MIC-nek, csak a törzs jellemzésére szolgálnak. **6 µg/ml nem konvertálható 8 µg/ml-nek!**

Negatív eredmény esetén a törzs érzékenynek interpretálható. Esetleges kétség felmerülésekor kérjük az érzékenynek tartott törzs referencia laborba küldését is

Pozitív eredmény esetén a törzset VISA/VRSA törzsnek kell interpretálni, és tovább kell küldeni referencia laborba megerősítésre.

Referencia:

1. <http://www.rivm.nl/earss/tools/>

2. **Wotton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA.** 2007.: A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 45:329-32.

Helyesbítés:

Az ezt megelőző számban megjelent „Lányi doktor munkásságának jelentősége a hazai klinikai és járványügyi bakteriológia fejlődésében” című írásomban az új diagnosztikai eljárások közt „*Campylobacter jejuni* diagnosztikájának bevezetése 1980-ban (OKI, Veszprém)” a zárójelben felsoroltak közül kimaradt Csongrád. Elnézést kérek, amennyiben Csongrád megyében is izoláltak *Campylobacter jejuni*-t 1980 februárjában, erről nem tudtam, de arra határozottan emlékszem, hogy ekkor küldtem fel az első izolátumot megerősítésre Dr. Ádám Máriának, aki elmondta, hogy neki is sikerült már izolálnia egy törzset. („Májusban 243 anyagot dolgoztunk fel, s ebből 11 esetben sikerült campylobactert izolálni.” Idézet az 1980 évi jelentéséből.)

Szeretném még hozzáfűzni a Csongrád megyei laboratórium, s személy szerint Dr. Kálmán Mária valóban sokat tett a campylobacter diagnosztika fejlesztésért, valószínű a legtöbb törzset is ők izolálták ez köztudott, ezt senki sem vitatja, mindenki elismeri természetesen én is. Nem véletlen, hogy a Campylobacter Referens laboratórium a Csongrád megyei ÁNTSZ-ben működik Kálmán Mária irányításával.

Dr Gacs Mária