



2010. X. évfolyam 4. szám

Tartalom:

Karácsonyi vers

***Atopobium vaginae* - a bakteriális vaginózis kimutatásának új „kulcsbaktériuma”** Irodalmi összefoglaló

Urbán Edit

Zoonotikus CA-MRSA törzsek megjelenése Magyarországon

Ungvári Erika, Tóth Ákos

Nyugat-nílusi vírusfertőzések

Bán Enikő, Szalkai Teodóra, Szomor Katalin, Takács Mária, Ferenczi Emőke

Karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok fenotípusos vizsgálata

Irodalmi áttekintés

Tóth Ákos

Karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok Magyarországon – az Országos Epidemiológiai Központ eredményei alapján

Tóth Ákos, Jánvári Laura, Ivelina Damjanova

A Mikrobiológiai Körlevél ezen számának megjelentetését a
Belföldi BIOLAB Zrt. támogatta



Alapító szerkesztők: Dr. Füzi Miklós (PhD)
Dr. Gacs Mária
Szerkesztő: Dr. Gacs Mária
Felelős szerkesztő: Dr. Visontai Ildikó
Operatív szerkesztő: Tirczka Tamás
Tóth Ákos

**A Mikrobiológiai Körlevelek az OEK honlapján
www.oek.hu elérhetőek.**

Tollas Tibor
Fenyők

**T
i
tű
levelű
csend kupolái
örök
zöld fenyvesek
a hó
alól is reményt szikrázni
csak zengjetek!
Isten nélküli istállók mélyén
ti őrzitek a szárnyatok alá menekült
Kisdedet.**

**Túl: arasznyi ágaitok szalmazsákokba rejtve,
ha örök
elkobozzák, rabok szabad szívében nyit tovább!
Némán is hirdessétek e gyűlölet –rengetegbe’:
csak a
szeretet
tehet
csodát.**

*Minden olvasónknak kellemes karácsonyi ünnepeket és
eredményekben gazdag boldog új esztendőt kívánunk!*

***Atopobium vaginae* - a bakteriális vaginózis kimutatásának új „kulcsbaktériuma”**

Irodalmi összefoglaló

Urbán Edit

Szegedi Tudományegyetem, Szent Györgyi Albert Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet

A bakteriális vaginózis (BV) igen gyakori tünetegyüttes, mely az érintett nők egy részében kifejezett panaszokat okoz, másoknál tünetmentesen van jelen. A kórkép etiológiája még napjainkban sem teljesen tisztázott. Nemzetközi konszenzus alapján a BV a normál *Lactobacillus* flóra eltűnésével járó olyan hüvelyi elváltozás, ahol a lactobacillusok helyét jellegzetes, komplex aerob-anaerob vegyes baktériumflóra veszi át, azonban a gyulladásos tünetek hiányoznak (1). A baktériumflóra minőségi- és mennyiségi összetétele és az általuk termelt anyagcseretermékek különbözhetnek az érintett személyeknél. A premenopauzában lévő nők ösztrogén termelésének hatására nő a glikogén termelődése a hüvely epithelialis sejtjeiben, mely glükózzá, majd tejsavvá bomlik a jelenlévő lactobacillusok metabolikus aktivitása következtében. A lactobacillusok és a fakultatív patogén baktériumok közötti egyensúly fenntartásában az antibiosis jelenségének fontos szerepe van. Abban az esetben, ha a hüvely ökológiai egyensúlya valamilyen tényező miatt felborul, a lactobacillusok dominanciáját a növekvő *Gardnerella vaginalis* csíraszám, majd a pH radikális emelkedése mellett vegyes anaerob flóra váltja fel. Ezt követően megjelennek a BV jellegzetes tünetei.

A bakteriális vaginózis kimutatásának lehetőségei: A BV diagnosztika kritériumainak összeállítása Amsel és *mtsai* nevéhez fűződik. A négy diagnosztikus jel (jellegzetes folyás, lúgos pH, pozitív amin-teszt és a kulcssejtek) közül háromnak a megléte megerősíti a BV diagnózist. Újabban egyre gyakrabban alkalmazzák a hüvelyváladék Gram-festésén alapuló diagnosztikát: a festett kenetben látható morfortípusok szerint adott pontszámok (Nugent score) alapján történő besorolást a BV diagnosztikájában. A baktériumok morfológiája alapján objektívebb megítélés válik lehetővé amellet, hogy a kulcssejtek is felismerhetők. Jelenleg a Gram-festést tartják a legmegbízhatóbb módszernek a BV diagnosztikájára, (Nugent-pontérték 7-10), hátránya, hogy azonnali, a vizsgálóasztal melletti diagnózist nem tesz lehetővé. Bakteriológiai tenyésztéses vizsgálatok: a bakteriológiai vizsgálatoknak a BV diagnosztikájában nincs gyakorlati jelentőségük. A BV organizmusok tenyésztése rendkívül kényes, időigényes és költséges munka. Tekintettel arra, hogy ezek a baktériumok lényegében a normál hüvelyflóra tajai, így

kimutatásuk nem diagnosztikus értékű, önmagukban semmit nem bizonyít. Egészen a közelmúltig a BV úgynevezett indikátor, vagy „kulcsbaktériumának” a *G. vaginalis*-t tartották, így a BV mikrobiológiai, újabban molekuláris diagnosztikájában kimutatása kiemelkedő szereppel bírt. Egyre több az irodalmi adat egy a közelmúltban felfedezett species, az *Atopobium vaginae* kulcsszerepéről a BV-ban. A speciest először 1999-ben írták le M. Rodriguez Jovita és *mtsai* egészséges nő hüvelyváladékából izolált törzsként (2), majd humán kórképben játszott patogén szerepére 2003-ban derült fény (3).

Az *Atopobium* genust Collins & Wallbanks (1992) írták le először a korábban *Lactobacillus minutus*- (Hauduroy *et al.*, 1937), *Lactobacillus rimae*- (Olsen *et al.*, 1991) és *Streptococcus parvulus*-ként (Weinberg *et al.*, 1937) elnevezett speciesek taxonómiai elhelyezésére (4). Filogenetikailag az *Atopobium* speciesek különálló csoportot képeznek, és az actinomycetesekhez állnak legközelebb. (Stackebrandt & Ludwig, 1994). Az *Atopobium* specieseket számos, különböző anatómiai helyekről származó humán mintából izolálták, a normál flóra tagjaiként: gingivális résekből (*Atopobium rimae*, *Atopobium parvulum*), illetve infekciózus kórképekből származó klinikai mintákból [például fogászati tályogok: *A. rimae*, *A. arvulunz*, abdominális váladékok, sebek, kismencedei tályogok (*Atopobium minutum*)]. A genus tagjai az eredeti leírás szerint fakultatív, a jelenlegi adatok alapján obligát anaerobok. Egyesével, helyenként párban, ritkán láncokban elhelyezkedő nem mozgó, kicsi Gram-pozitív elliptoid coccusok, vagy coccobacillusok, melyek nagy mennyiségű tejsavat termelnek. Columbia-alapú anaerob véres agaron 37°C-on, 48 h-án keresztül anaerob körülmények között történő inkubálás után kicsi, gombostüfejnyszerű, szürkésfehér telepeket képeznek (2). Biokémiai sajátásaikat az 1. táblázat mutatja be. A Gram-pozitív baktériumonkon belül az actinomycetes csoport tagjaival való szoros filogenetikai kapcsolat ellenére az *Atopobium* speciesek nem képeznek kivételt, holott fenotípusosan gyakran összetévesztik az alacsony G + C-tartalmú tejsav termelő baktériumokkal. A kimutatásukra jelenleg főleg a molekuláris diagnosztikai módszereken alapuló (16S rRNS gén szekvenálás) eljárásokat alkalmazzák, mivel a legtöbb, kereskedelmi forgalomban kapható gyári identifikáló kit nem alkalmas a törzsek species szintű meghatározására. Diagnosztikai és terápiás megfontolásból is rendkívül fontos az a megfigyelés, hogy a törzsek hasonlóan magas szintű metronidazol és secnidazol (a BV terápiájában leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok a nitro-5'-imidazolok: metronidazol, ornidazol, *secnidazol*, tinidazol) rezisztenciával rendelkeznek, azonban penicillinre, penicillin-származékokra, vancomycinre, makrolidokra, clindamycinre érzékenyek bizonyulnak (5).

A species humán kórfolyamatokban játszott szerepe kérdéses volt, az első bizonyítottan emberi fertőzéses eredetű kórképből izolált patogén törzset, mely egy 39 éves nőbeteg tuboovariális tályogából származott, 2003-ban

identifikálták és írták le (3). Az akkor izolált és molekuláris diagnosztikai vizsgálatokkal (PCR amplifikáció és a 16S rRNA gén 1 437 bp szekvencia analízise) azonosított *A. vaginae* ATTC kontroll törzset (GenBank reference No. AF325325) az API ID32A (bioMérieux, Franciaország) *Gemella morbillorum*-ként identifikálta.

Az *Atopobium vaginae* előfordulása és a BV közötti összefüggést az elmúlt évek során több kutatócsoport is vizsgálta: Ferris és *mtsai* 2004-ben 46 „normális” és a Nugent score alapján BV-nek minősített hüvelyváladékot vizsgáltak meg molekuláris diagnosztikai módszerekkel (6). Vizsgálataik alapján az *Atopobium vaginae* a BV pozitív páciensek többségében (12/22) kimutatható volt, míg az “egészséges” hüvelyváladékokban jóval ritkábban (2/24) ($P < 0,001$). Véleményük szerint az *A. vaginae* kiemelkedően fontos komponense annak a komplex bakteriális biofilmnek és mikroökológiai rendszernek, mely az abnormális hüvelyi baktériumflórát alkotja és jelző, “kulcs” baktériuma lehet a BV-nak, és igen jelentős szerepet játszhat a metronidazol-kezelés elleni sikertelenségben. Bradshaw és *mtsai* 2006-ban 358 rendellenes hüvelyi folyással rendelkező nő hüvelyváladékát vizsgálták meg PCR módszerrel, *Gardnerella vaginalis* és *A. vaginae* kimutatás céljából (7). Az *A. vaginae* kimutatás 96%, a *G. vaginalis* 99% szenzitivitással rendelkező BV kimutatására összehasonlítva a Nugent score- módszerrel, azonban az *A. vaginae* kimutatása sokkal specifikusabb volt a BV-re, (77% versus 35%), mint a *G. vaginalis*. Tanulmányukban *G. vaginalis*-t 100%-ban, *A. vaginae*-t 75%-ban sikerült kimutatniuk rekurrens BV-ben szenvedő nőkben; *A. vaginae*-t ritkán sikerült *G. vaginalis* nélkül detektálni, ill. azokban a nőbetegekben, akiknél mindkét organizmust együtt kimutatták, nagyobb volt a rekurrens BV aránya (83%), mint amikor egyedül a *G. vaginalis* jelenlétét sikerült detektálni: 38% ($P < 0,001$). Véleményük szerint az *A. vaginae*-infekció sokkal specifikusabb a BV-re, mint a *G. vaginalis* infekció. A magasabb kiújulási arány azoknál a nőknél, akiknél mind az *A. vaginae*-t, mind a *G. vaginalis*-t együttesen kimutatták, arra utalnak, hogy az *A. vaginae* jelentősen hozzájárul a BV kialakulásához, etiológiai szerepe azonban mindezidáig még nem tisztázott. Ugyanez a kutatócsoport 44 intakt nő hüvelyváladékát vizsgálta meg PCR módszerrel, *G. vaginalis* és az *A. vaginae* kimutatás céljából (8). 20 nőnél tudtak (45%) *G. vaginalis*-t kimutatni, de csak 3 (7%) esetben *A. vaginae*-t. Vizsgálatainkban a *G. vaginalis* jelenléte szignifikánsan magasabb volt abban a csoportban, ahol a kitöltött kérdőívek alapján a nők orális szexet gyakoroltak, illetve kéz (nyál) -genitális kontaktusuk volt. Burton és *mtsai* tünetmentes, a Nugent score alapján BV pozitív posztmenopauzális nők hüvelyváladékának 44%-ában mutatták ki a baktériumot, míg egészségesekben nem sikerült kimutatni az *A. vaginae*-t (9). Thies és *mtsai* hasonló eredményre jutottak, amikor 70 hüvelyváladék (50 BV, 20 egészséges) mintát vizsgáltak meg a 16S

rRNS gén RFLP fingerprinting módszerrel (10). A BV pozitív minták 96%-ában tudtak *A. vaginae*-t kimutatni, szemben a *G. vaginalis*-sal, mely csak a BV pozitív minták 64%-ában volt jelen. Az egészséges nők hüvelyváladékában sem *G. vaginalis*-t, sem *A. vaginae*-t nem sikerült detektálniuk. Több tanulmány szerzői is egymástól függetlenül arra a következtetésre jutottak, hogy a rekurrens, illetve metronidazol terápia rezisztens BV esetekben a BV-t alkotó biofilmben az *A. vaginae* csíraszámja jóval magasabb volt, mint azokban az esetekben, ahol a terápia sikeres volt (7, 10-12).

Az irodalomban publikált kutatási adatok alapján nem meglepő, hogy az *A. vaginae*-t eddig nem hozták összefüggésbe a BV-al. Izolálása, identifikálása a hagyományos, biokémiai módszerekkel meglehetősen nehézkes, gyakran félreidentifikált. Gram-szerint festett kenetben morfológiája nem tipikus: kicsi Gram pozitív coccobacillusok, a komplex flórában nagyon nehéz elkülöníteni a BV-t alkotó egyéb baktériumoktól. Eredetileg az *Atopobium* genusba tartozó speciesteket számos esetben a lactobacillusok közé sorolták, a gyári identifikációs kitekkel pedig több esetben is *Gemella morbillorum*-ként identifikálták. Klinikai mintákból történő korrekt kimutatása és identifikációja a modern molekuláris diagnosztikai módszerek megjelenésének köszönhető. A legújabb közlemények alapján a baktérium kimutatása megfelelő specifikus targete lehet a BV kimutatására szolgáló gyári kit-eknek, kereskedelmi forgalomban kapható, illetve „home-made” PCR módszereknek (8-13).

Táblázat: Az *Atopobium* speciestek biokémiai elkülönítő reakciói *

+: pozitív, -: negatív, V: változó

Enzim termelés	<i>A. vaginae</i>	<i>A. minutum</i>	<i>A. parvulum</i>	<i>A. rimae</i>
Acid foszfatáz	+	-	+	+
Alanin arilamidáz	-	-	+	-
Arginin dihidroláz	+	+	-	-
Arginin arilamidáz	+	+	+	-
Hisztidin arilamidáz	+	-	-	-
Galaktozidáz	-	-	+	-
Leucin arilamidáz	+	-	+	-
Prolin arilamidáz	+	+	-	-
Piroglutamátsav arylamidáz	-	V	+	+
Glycin arilamidáz	+	-	+	-
Szerin arilamidáz	+	-	-	-
Tirozin arilamidáz	-	-	+	-

* Mar Rodriguez Jovita, M.D. Collins, B.Sjoden és E. Falsen közleménye (2) alapján

Irodalom:

1. Hillier SL, Homes KK: Bacterial Vaginosis. Sexually Transmitted Diseases (Edited by: Homes KK, Sparling PF, Mardh PA, Lemon SM, Stamm WE, Piot P and Wasserheit). New York, McGraw-Hill pp.: 563-86. (1999)
2. Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjoden B, Falsen E: Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:1573-6. (1999)
3. Geissdorfer W, Bohmer C, Pelz K, Schoerner C, Frobenius W, Bogdan C: Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. *J Clin Microbiol* 41:2788-90. (2003)
4. Collins MD, Wallbanks S: Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus parvulus*: proposal for the creation of a new genus *Atopobium*. *FEMS Microbiol Lett* 1992, **74**:235-240.
5. De Backer E., Dubreuil L., Brauman M., Acar J., Vanechoutte M.: In vitro activity of secnidazole against *Atopobium vaginae*, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection* 16:470–2. (2009)
6. Ferris MJ., Maszta A., Martin DH.: Use of Species-Directed 16S rRNA Gene PCR Primers for Detection of *Atopobium vaginae* in Patients with Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol* 42:5892-4. (2004)
7. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM: The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis.* 194(6):828-36. (2006)
8. Tabrizi SN, Fairley CK, Bradshaw CS, Garland SM.: Prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in virginal women. *Sex Transm Dis* 33(11):663-5. (2006)
9. Burton JP, Devillard E, Cadieux PA, Hammond JA, Reid G.: Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *J Clin Microbiol* 42(16):1829–31. (2004)
10. Thies FL, König W, König BJ: Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *Med Microbiol* 56:755-61. (2007)
11. Valyshev AV, Elagina NN, Bukharin OV: Anaerobic microflora of the female reproductive tract. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 78-84. (2001)
12. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vanechoutte M.: Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol* 4:1573–6. (2004).
13. Menard JP, Mazouni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F.: Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:1547-52. (2010)

Zoonotikus CA-MRSA törzsek megjelenése Magyarországon

Ungvári Erika, Tóth Ákos

Bár a methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) továbbra is a legelterjedtebb nosocomialis patogének egyike, a 90-es évek óta egyre nagyobb problémát jelentenek a területen akvirált MRSA (community-associated, CA-MRSA) törzsek. Az elmúlt néhány évben egy speciális MRSA klón megjelenését figyelték meg humán infekciókban. A törzsek vizsgálata során a forrás kutatások állati, elsősorban sertés és szarvasmarha eredetet igazoltak, ez utóbbira utal a LA-(livestock-associated) MRSA elnevezés.

Az LA-MRSA törzsek egyik legjellegzetesebb sajátossága, hogy az MRSA törzsek tipizálására „gold standardként” használt pulsed-field gélelektroforézis (PFGE) vizsgálattal (a rutinszerűen alkalmazott *SmaI* restrikciós endonukleázzal) nem tipizálhatók, így kezdetben NT-MRSA-nak is nevezték. A további tipizálási vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a törzsek mindegyike egy igen ritka, a 398-as multilókusz szekvencia típus klonális komplexébe (CC398) tartozott. A továbbiakban a CC398 komplexbe tartozó LA-MRSA állati és humán elterjedtségéről, klinikai vonatkozásairól és hazai megjelenéséről számolunk be.

Az LA-MRSA felbukkanását elsőként 2003-ban, Hollandiában írták le sertéstartó farmokon. Azonos, NT-MRSA törzseket izoláltak sertésekből, farmerekből és hozzátartozóikból, és bizonyították az emberek és sertések közötti közvetlen átvitelt is **(1, 2)**. Egy holland eset-kontroll tanulmány megerősítette, hogy haszonállatokkal elsősorban sertéssel vagy szarvasmarhával kapcsolatba került személyek körében gyakoribb a CC398-as MRSA hordozás, illetve az általuk okozott infekciók **(3)**. Azóta számos európai országban (pl. Dánia, Németország, Ausztria, Belgium), Kanadában, USA-ban és Kínában is észlelték az LA-MRSA törzsek megjelenését mind az állatok, mind a velük dolgozó emberek körében. Különösen magas hordozási arányt figyeltek meg farmerek, állatorvosok és vágóhídi dolgozók között, akik gyakorta kerülnek közvetlen kontaktusba élő haszonállatokkal **(4)**.

Az élelmiszerek előállítására tartott állatok (pl. sertés, borjú, brojler csirke) gyakran tünetmentesen hordozzák a CC398-as MRSA-t **(4, 5)**. Több országban leírták a LA-MRSA törzsek előfordulását az élelmiszerláncban is. de Boer és mtsai a holland kiskereskedelmi forgalomban lévő húsminták 11%-ában mutattak ki MRSA szennyeződést, és az izolált törzsek 85%-a bizonyult CC398 MRSA-nak **(6)**. A LA-MRSA élelmiszerláncba történő bejutásával a hús feldolgozás/fogyasztás révén is lehetőség nyílik MRSA kolonizáció vagy infekció kialakulására.

Az állatokban megfigyelt LA-MRSA kolonizáció magas arányának emberi populációra gyakorolt hatása még kevéssé ismert. Hollandiában, ahol az élelmiszerek előállítására tartott állatállományban magas a CC398-as MRSA hordozás, ez a klón jelentősen befolyásolja az MRSA epidemiológiáját az egészségügyi intézményekben. A holland MRSA surveillance adatai alapján 2008. végére a humán klinikai mintákból izolált MRSA törzsek között az NT-MRSA törzsek aránya elérte 42%-t (www.rivm.nl/mrsa). A LA-MRSA törzsek nemcsak állatról emberre terjedhetnek kontakt úton, hanem emberről emberre is, akár a kórházi környezetben is. Az első kórházi járványt egy holland kórház sebészeti osztályáról jelentették (7).

Bár jelenleg a humán esetek döntő többsége kolonizáció, ritkán előfordulnak CC398-as MRSA törzsek által okozott súlyos infekciók is: pl. bacteraemia, endocarditis, pneumonia, osteomyelitis (8, 9).

Az LA-MRSA ST398-as törzsek hazai megjelenésére az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) által szervezett 2008-as felmérés során derült fény, a törzseket az Országos Állategészségügyi Intézetben 3 sertéstelepről származó pormintából izolálták (10).

2009 szeptembere óta az Országos Epidemiológiai Központ *Staphylococcus aureus* Nemzeti Referencia Laboratóriumba (SRL) beküldött MRSA törzsek között 10 LA-MRSA ST398-as törzset azonosítottak. Négy esetben történt járványügyi vizsgálat.

A törzseket klinikai mintákból izolálták, 4 esetben sebváladékból, 1-1 esetben hemokultúrából, BAL-ból és drainből. Három beteg esetén a törzsek orr/torok mintákból származtak. Az eddig beérkezett klinikai adatok alapján két betegnél osteomyelitis, egy betegnél pedig pneumónia alakult ki. A járványügyi vizsgálat két esetben tárt fel direkt kontaktust haszonállattal. A betegek egyike otthonában sertést vágott, míg egy másik beteg húsfeldolgozóban dolgozott. (1. táblázat)

1. táblázat LA-MRSA-gyanús esetek adatai

Törzs	Izolálás helye	Szakrendelő/ Osztály	Ellátás típusa	Minta típusa	Beteg életkora	Klinikai kép
321/09	Miskolc	Trauma.	Fekvő	sebváladék	38 év	-
398/09	Cegléd	Trauma.	Fekvő	sebváladék	52 év	osteomyelitis
405/09	Jászberény	Krónikus Bel.	Fekvő	orrváladék_szűrő	70 év	bronchitis
21/10	Debrecen	AITO	Fekvő	BAL	37 év	tüdőgyulladás
61/10	Veszprém	Bel.	Fekvő	drain	61 év	-
64/10	Cegléd	Trauma.	Fekvő	sebváladék	36 év	osteomyelitis
97/10	Keszthely	Bel.	Fekvő	hemokultúra	72 év	-
101/10	Budapest	Gyermek Kh.	Fekvő	sebváladék	14 év	égett bőrfelület
176/10	Debrecen	Fül-orr-gégészet	Járó	torok	71 év	-
213/10	Nyékládháza	Háziorvos	Járó	orrváladék_szűrő	39 év	-

Mindegyik törzs tetracyclin rezisztensnek bizonyult. Az irodalmi adatoknak megfelelően ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia ritkán fordult elő, mindkét törzs esetén csak alacsony szintű volt a rezisztencia (MIC: 8 mg/L). A törzsek makrolid, linkozamid, aminoglikozid érzékenysége nagyon változatos képet mutatott. Két törzs erythromycin érzékenynek és clindamycin rezisztensnek bizonyult. Mindkét törzsnél alacsony szintű volt a clindamycin rezisztenciát (MIC: 2mg/L). Egyik törzs sem hordozta a PhLOPS_A rezisztencia fenotípust okozó Cfr 23S rRNS metiltranszferázt kódoló (*cfr*) gént, ami phenicol, linkozamid, oxazolidinon (linezolid), pleuromutilin és a streptogramin A antibiotikumokkal szembeni együttes rezisztenciát biztosít. Mindegyik törzs quinupristin/dalfopristin, linezolid, tigecyclin és vancomycin érzékenynek bizonyult. (2. táblázat)

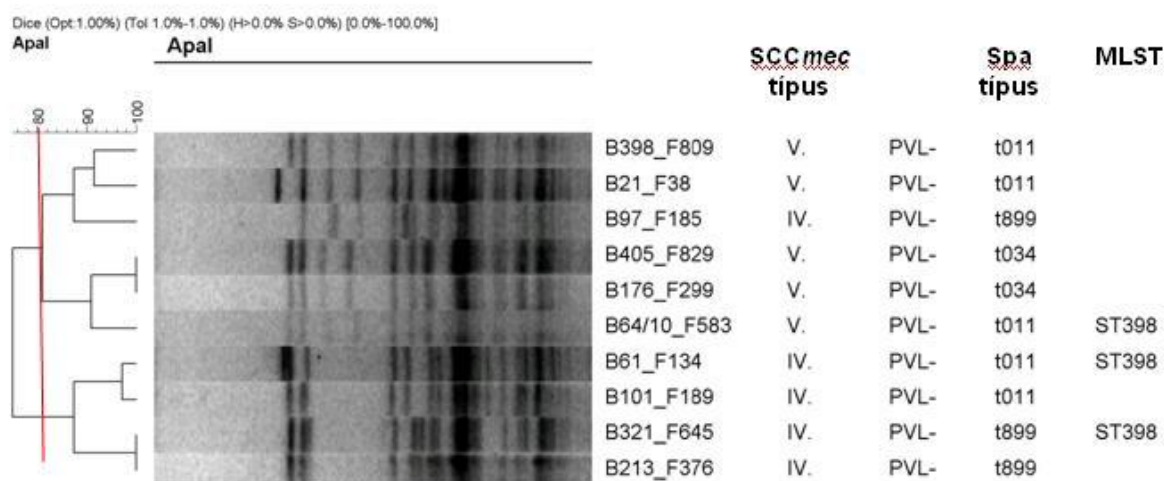
2. táblázat Klinikai mintákból izolált LA-MRSA törzsek (n=10) antibiogramja.

Törzs	CIP	CLI	ERY	KAN	GEN	SXT	TET	RIF	Q/D	LZD	TGC	VAN
321/09	E	E	E	E	E	E	R	E	E	E	E	E
398/09	r*	r*	E	E	E	E	R	E	E	E	E	E
405/09	E	R	R	E	E	E	R	E	E	E	E	E
21/10	r*	E	E	E	E	E	R	E	E	E	E	E
61/10	E	E	E	R	R	E	R	E	E	E	E	E
64/10	E	E	E	R	E	E	R	E	E	E	E	E
97/10	E	R	R	E	E	E	R	E	E	E	E	E
101/10	E	r*	E	R	R	E	R	E	E	E	E	E
176/10	E	R	R	E	E	E	R	E	E	E	E	E
213/10	E	E	E	E	E	E	R	E	E	E	E	E

CIP: ciprofloxacin; CLI: clindamycin; ERY: erythromycin; KAN: kanamycin; GEN: gentamicin; SXT: trimethoprim-sulphamethoxazol; TET: tetracyclin; RIF: rifampicin; Q/D: quinupristin/dalfopristin; LZD: linezolid; TGC: tigecyclin; VAN: vancomycin

*r: alacsony szintű rezisztencia

Egyetlen törzs sem hordozta a CA-MRSA törzsekre jellemző Panton-Valentine leukocidin (PVL) toxin génjét. Mindegyik törzs IV. vagy V. *SCCmec* kazettát tartalmazott. Egyik törzs sem volt tipizálható PFGE vizsgálattal, *SmaI* restriktációs endonukleázt használva (PFGE típus: *SmaI*-NT). A törzsek az ST398-as klónra jellemző t011 (n=5), t899 (n=3), t034 (n=2) spa típusokba tartoztak. Az ST398-as MRSA törzsek jellemzésére használt *Apal* restriktációs enzimmel elvégzett PFGE vizsgálat során, a törzsek két PFGE típusba tartoztak (80%-os homológia határnál). Az egyik PFGE típusba csak IV-es, a másik típusba – egy kivételével- V-ös *SCCmec* típusú törzsek tartoztak. A t034 spa típusú törzsek V-ös, a t899 spa típusú törzsek IV-es *SCCmec* kazettát hordoztak, ugyanakkor a leggyakrabban előforduló t011 spa típusú törzsekben mindkét *SCCmec* típus előfordult. (1. ábra)



1. ábra Klinikai mintákból izolált LA-MRSA törzsek (n=10) tipizálási eredményei

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy LA-MRSA ST398-as törzsek Magyarországon is megjelentek, melyek többségét súlyos infekciók során izolálták. Egyelőre az OEK SRL-ba beküldött törzsek körében az LA-MRSA törzsek száma nem jelentős, figyelemreméltó azonban, hogy valamennyi az utóbbi egy évben került izolálásra. Az LA-MRSA hazai megjelenésével, az állatokkal közvetlen kapcsolatba kerülők körében is számolni kell a területen előforduló MRSA infekciókkal.

Ahhoz, hogy a hazai LA-MRSA törzsek által okozott infekciókat és a törzsek mikrobiológiai sajátosságait jobban megismerhessük, kérjük, hogy a

tetracyclin rezisztens MRSA törzseket a szíveskedjenek beküldeni az OEK SRL-ba.

Irodalomjegyzék

1. Voss A *et al* (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. EID 11: 1965-6.
2. Huijsdens XW *et al* (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. Ann Clin Microbiol Antimicrob 5: 26.
3. van Loo I *et al* (2007) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. EID 13(12): 1834-1839.
4. Catry B *et al* (2010) Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. Epidemiol Infect 138: 626-644.
5. Cuny C *et al* (2010) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. Int J Med Microbiol 300: 109-117.
6. de Boer E *et al* (2009) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. Int J Food Microbiol 134: 52-56.
7. Wulf MW *et al* (2008) First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. Euro Surveill. 13 (9). pii:8051.
8. Witte W *et al* (2007) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. EID 13: 255–8.
9. Ekkelenkamp MB *et al* (2006) Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* originating from pigs (in Dutch) Ned Tijdschr Geneesk 150: 2442–7.
10. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: MRSA prevalence estimates; on request from the European Commission. EFSA Journal 2009; 7(11):1376. [82 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2009.1376. Available online: www.efsa.europa.eu

Nyugat-nílusi vírusfertőzések

Bán Enikő, Szalkai Teodóra, Szomor Katalin, Takács Mária, Ferenczi Emőke

Bevezetés

A Nyugat-nílusi vírus a *Flaviviridae* család *Flavivirus* nemzetségébe tartozik, azon belül pedig a Japán encephalitis antigén-komplex tagja. A vírust először 1937-ben, egy Uganda West Nile (Nyugat-Nílus) tartományában élő lázas nő véréből izolálták (Smithburn és mtsai, 1940). Az arbovírusok földrajzi előfordulására végzett góckutatás során izoláltak 1972-ben és 1976-ban két Nyugat-nílusi vírus törzset hazánkban (Molnár, 1982), majd 2003-tól a vírus humán megbetegedéseket is okozott. A közte levő időszakban emberi, vagy állati megbetegedésben kóroki szerepét nem tudták igazolni Magyarországon. E betegség elsősorban madarak között terjed szúnyogcsípés révén, az ember csak véletlenül fertőződik. A vírusnak az emberhez hasonló járulékos gazdái lehetnek más emlősök is, köztük lovak, juhok, és más háziállatok, valamint vadon élő madarak és kisemlősök. Európában a kórokozó természeti körforgása két jellegzetességet mutat. A vidéki (erdei) formában a vízi madarak és a madárvért kedvelő (ornitofil) szúnyogfajok, a városi formában pedig az ember környezetében élő madarak, illetve a madár- és embervért egyaránt kedvelő szúnyogfajok (*Culex pipiens*, *Culex modestus*) tartják fenn a folyamatot.

Klinikai tünetek

A klinikai tünetek másképp jelennek meg bizonyos fajoknál, egyesek érzékenyebben reagálnak rá, míg más fajoknál a Nyugat-nílusi vírusfertőzés tünetmentesen zajlik le, és csak utólag a vérben megjelenő ellenanyagok kimutatásával igazolható. A madarakban ugyancsak változó a vírusfertőzés következménye. Egyes fajok tünetmentesen vészeli át, míg másokban halálos kimenetelű is lehet. Ez utóbbi számos madárfajnál, különösen a varjaknál jellemző, nagyfokú érzékenyséjük miatt (Komar, 2003). A fertőzés általános tünetei a levertség, gyengeség és néhány esetben vérzés (Komar és mtsai, 2003). Magyarországon, 2003-ban ludakon a mozgáskoordináció hiányát, a test görcsös merevedését, és ritmikus fej-nyakmozgásokat lehetett tapasztalni (Glávits és mtsai, 2005). Kutatások bizonyították, hogy a vírussal fertőzött lovak 10%-a mutat klinikai tüneteket (Bunning és mtsai, 2002). A lovak betegsége magatartási zavarokkal, levertséggel, depresszióval kezdődik, emellett láz, inkoordinált mozgás, izomrángás, izommerevség (spasmus), izomerő-csökkenés (paresis) és fokozott érzékenység tüneteivel jár. 2005-ben, hazánk középső részéről származó anyajuhon Nyugat-nílusi vírus okozta idegrendszeri tüneteket figyeltek meg a kutatók, majd az állat az alkalmazott tüneti kezelés ellenére négy napos betegeskedés után elhullott (Kecskeméti és mtsai, 2007). A Nyugat-nílusi vírus által okozott emberi fertőzés az esetek nagyobb részében

tünetmentesen zajlik le (kb. 80-85%), a fennmaradó 15-20 %-ban enyhébb tünetek jelentkeznek, melyek nem jellegzetesek, ezért a klinikai kép alapján nehezen különíthetők el más vírusbetegségektől (nyugat-nílusi láz). Ritkán 2-6, legfeljebb 14 napos lappangási idő után nem specifikus „influenzaszerű” betegség alakul ki. Erre jellemző a hirtelen kezdetű magas láz, borzongás, hidegrázás, rossz közérzet, fejfájás és izom-izületi fájdalmak. Ritkábban émelygés, hányás, hasmenés, köhögés, torokfájás is lehet. Alkalmanként kötőhártya-gyulladás, az arc kipirulása és nyirokcsomó megnagyobbodás észlelhető. A fertőzöttek felénél maculopapulosus vagy halvány roseola jellegű bőrkiütés figyelhető meg. A panaszok 1- 2 hét alatt spontán múlnak el, a felépülés teljes, ritka szövődmény a hepatitis, a hasnyálmirigy-gyulladás és a szívizomgyulladás (Budai, 2003). A becslések szerint a Nyugat-nílusi vírussal fertőzött 150-200 személy közül egynél jelentkezik a betegség súlyosabb, neuroinvazív kórkép formájában. 1000 fertőzött közül egy esetében a legsúlyosabb, halálos kimenetelű encephalitis alakulhat ki (Epinfo, 2005). A súlyosabb kimenetelű vírusfertőzések a nagyon fiatalokat (csecsemők, gyerekek), az 50 év felettieket, a legyengült immunrendszerű személyeket, és egyéb alapbetegségben szenvedőket (cukorbeteg, szív-és vesebeteg) veszélyeztetik.

A vírus ökológiája

A vírus nagy területeken- Afrikában, Nyugat-Ázsiában, Európában és Ausztráliában- honos. A vírus elsődleges gazdái elsősorban a különböző vándorló madarak, terjesztői pedig különféle szúnyogfajok. Az amerikai kontinensre, New York körzetébe 1999-ben hurcolták be Izraelből. Az azt követő négy évben ebből a gócból nyugati és dél-nyugati irányba jelentős terjedés történt. Napjainkra az USA csaknem valamennyi állama fertőzött, később megjelent Kanada Ontario tartományában is. Ez az expanzió ökológiailag sajátos jelenség, hiszen a Nyugat-nílusi vírus számára inkább a magasabb hőmérsékletű régiók kedvezőek, mintsem a mérsékelt, időnként hideg kontinentális klimatikus viszonyok. Egy másik fontos megállapítás, mind az Óvilágot, mind az Újvilágot figyelembe véve, hogy az amerikai kontinensre való belépése után a Nyugat-nílusi vírus virulenciája nőtt a helyi madár populációban, és egyre többször okozott súlyos, halálos kimenetelű megbetegedéseket. Számos kutató gondolja úgy, hogy a vírus egy új formája jelent meg (Malkinson, 2002). A vírustranzmisszió szinte teljes mértékben a nyári és a kora őszi hónapokra, a szúnyogok aktivitásának időszakára korlátozódik. A Nyugat-nílusi vírus, mint minden ízeltlábúval terjesztett vírus, a gerincesekben és a vérszívó vektorban is képes szaporodni. A vírusnak magas titerben jelen kell lennie a gerinces gazda vérében ahhoz, hogy megfertőzze a vérszívó vektort (ezért nem terjed szúnyogcsípéssel emberről-emberre). A vírus

szaporodik az ízeltlábú belében, és azután eljut egyéb szervekbe, így a nyálmirigybe is. Kizárólag a nőtény ízeltlábúak a vírus terjesztői. Meghatározott időszakra, ún. extrinsic inkubációs szakra van szükség, amíg a vektor nyálában elegendő vírus gyűlik össze (-10^7 PFU/ml), hogy a vírus továbbterjedjen. A vadon élő madarak szerepe egyes kórokozók terjesztésében és fertőzési láncok fenntartásában régóta ismert (McDiarmid, 1969). Számos madárfaj esetében azonban nagy létszámú populációk élnek együtt ugyanazon az élőhelyen, illetve a különböző fajok hasonló táplálkozási szokásai és közös élőhelye miatt (pl. vízimadár fajok) gyakori az egyedek közti közvetlen, vagy közvetett érintkezés, amely a kórokozók átjutásához kedvező feltételeket teremt (Hubalek, 1994). A vadon élő madarak közül különös járványtani jelentőséggel bírnak a vonuló fajok (Rosicky, 1965).

A Nyugat-nílusi láz vírusfertőzés szerológiai diagnosztikája

Mivel humán megbetegedések esetén (mind a kiütéssel járó lázas megbetegedés, mind a kórkép neuroinvaszív formája esetén) a vírus szöveten vagy szopósegérben történő izolálására illetve polimeráz láncreakcióval történő detektálására már kevés remény van; így a diagnosztika alapját nemzetközi ajánlások szerint is a szerológiai vizsgálatok jelentik (Epinfo 2005¹).

Magyarországon az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) Virális Zoonózisok Nemzeti Referencia Laboratóriuma végzi a Nyugat-nílusi láz vírusfertőzés diagnosztikáját humán mintákból. A 18/1998. (VI.3) Népjóléti Minisztériumi Rendelet értelmében a vizsgálati minta az OEK-ba küldendő, a megbetegedés illetve annak gyanúja meningitis serosa vagy encephalitis infectiosa diagnózissal bejelentendő. Az Általános Vírusdiagnosztikai Osztályon serosus meningitis vagy encephalitis esetén nem csak a kezelőorvos által kért esetben, hanem minden, a „szokásos” kórokozók (KEV, LCM, herpesvírusok, enterovírusok) irányában végzett, de negatív vagy kétes eredménnyel végződő vizsgálatot követően a Nyugat-nílusi láz vírus irányában is el kell végezni a vizsgálatot.

Laboratóriumunkban a diagnosztika alapját az *indirekt immunfluoreszcens (IIF)* módszer képezi. Az antigén házilag készül, szopósegér agyban felszaporított vírusszuszpenzióval fertőzött Vero szövetet (afrikai zöldmajom vese epithel sejtek) fixálunk tárgylemezre. Vérminta esetén a savó megfelelő hígítását inkubáljuk az antigént tartalmazó tárgylemezen, időt engedve a mintában esetlegesen jelen levő vírus ellenes specifikus antitestek sejtbe jutásához. Ezután fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelzett anti-humán IgG vagy IgM konjugátummal tesszük detektálhatóvá az intracellulárisan kötött IgG vagy IgM antitesteket.

Az IIF verifikálásaként *hemagglutináció-gátlás vizsgálatot (HAG)* alkalmazunk, mely vizsgálat szintén alkalmas mind össz-ellenanyag, mind IgM

kimutatására. A HAG antigént a vírust szopósegér agyban felszaporítva házilag gyártjuk.

A kétes illetve pozitív esetek további verifikálására *Nyugat-nílusi láz vírus IgM capture ELISA* vizsgálatot alkalmazunk harmadik vonalban.

Keresztreaktivitás esetén a *neutralizációs vizsgálat* (szöveten vagy szopósegéren) segíthet a pontos diagnózis felállításában, ez azonban laboratóriumunkban nem rutin módszer.

Az eredmények értékelése

Mindhárom szerológiai vizsgálat értékelésekor figyelembe kell venni a *Flavivírus* nemzetségbe tartozó vírusok (pl.: kullancsencephalitis vírus, Nyugat-nílusi láz vírus, Usutu vírus, dengue vírusok, sárgaláz vírus, stb.) között fennálló szerológiai keresztreaktivitás lehetőségét, mely igen megnehezítheti az értékelést és az eredmények interpretálását. Sok esetben nehéz a specifikus reakció megítélése akár mindhárom fent említett szerológiai módszer beállítása után is. Keresztreaktivitás oka lehet:

1. Jelen ismereteink szerint Magyarországon minimum kétféle flavivírus, a kullancsencephalitis vírus (KEV) és a Nyugat-nílusi láz vírus (West Nile virus - WNV) endémiás, így előfordulhatnak kettős vagy időben egymást követő fertőzések. A KEV inkább az ország északi és nyugati területein (Északi-középhegység és Dunántúl), a Nyugat-nílusi láz vírus inkább a keleti, délkeleti területeken (Békés, Bács-Kiskun, Hajdú-Bihar, stb. megyék) fordult eddig elő, de egyre növekvő területen van átfedés a két vírus előfordulásában.

2. Korábban KE vagy sárgaláz ellen immunizált (oltásban részesült) emberek detektálható ellenanyaga.

3. Importált akut dengue láz megbetegedések, melyeket növekvő számban diagnosztizálunk.

- 4., Esetleges Usutu vírusfertőzés, mely jelen ismereteink szerint kifejezetten állatokat (feketerigó) betegít meg. Irodalmi adatok szerint képes az embert is megfertőzni, sőt immunkárosodott személyekben súlyos lefolyású betegséget okozni.

Egy 1999-ben egészséges véradók körében (5312 vérminta) végzett szeroepidemiológiai vizsgálat eredménye alapján az országos átvészelttség 0,56% (Szalkai, 2008). 2003 és 2010 között az akut megbetegedések éves esetszáma 1-20 között mozog, a beküldött esetek többsége idegrendszeri megbetegedés képében jelentkezett.

A Nyugat-Nílusi vírusfertőzés átvészélése nem véd meg egy későbbi KE vírusfertőzéstől és fordított (sorrendben) esetben sem. Az is kérdéses, hogy a hazánkban forgalomban lévő inaktivált KE vakcinák egy előzetes flavivírus fertőzést követően kialakítanak-e megfelelő védettséget KE vírussal szemben.

Ez indokoltá teszi-e betegpopuláció kontrollált oltását és szerológiai válaszának követését a jövőben.

Irodalom:

1. A Nyugat-Nílushi láz európai surveillance-a. *Epinfo* 2005; 12(13):125-133
2. Budai J. (ifj.). A Nyugat-Nílushi vírus (West Nile Virus-WNV) encephalitis. *Családorvosi Fórum* 2003;10:13-18
3. Bunning, M. L., Bowen, R. A., Cropp, C. B., Sullivan, K. G., Davis, B. S., Komar, N., Godsey, M. S., Baker, D., Hettler, D. L., Holmes, D. A., Biggerstaff, B. J., and Mitchell, C. J. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8:380–386.
4. CDC. Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the US: Guidelines for Surveillance, Prevention and Control. 3rd Edition 2003. p.25.
5. [Glávits R](#), [Ferenczi E](#), [Ivanics E](#), [Bakonyi T](#), [Mató T](#), [Zarka P](#), [Palya V](#).: Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian Pathol.* 2005 Oct;34(5):408-14.
6. Hubalek, Z. 1994. Pathogenic microorganisms associated with free-living birds (a review). *Acta Scientiarum Naturalium Brno* 28: 1–74.
7. Kecskeméti S, Bajmócy E, Bacsadi Á, Kiss I, Bakonyi T. Encephalitis due to West Nile virus in a sheep. *Vet Rec.* 2007 Oct 20;161 (16):568-9 17951568
8. Komar N. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res.* 2003; 61:185–234
9. Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., and Bunning, M. (2003a). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9:311–322.
10. Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M. T., and Deubel, V. (2002). Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating White Storks. *Emerg. Infect. Dis.* 8:392–397.
11. McDiarmid, A. 1969. Diseases in free-living wild animals. Academic Press, London, UK, 332 pp.
12. Molnar E. (1982) Occurrence of tick-borne encephalitis and other arboviruses in Hungary. *Geographia Medica.* 12:78–120.
13. Rosicky, B. 1965. Types of animal movements and their influence on natural foci of diseases. In *Theoretical questions of natural foci of diseases*, B. Rosicky and K. Heyberger (eds.). Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia, pp. 151–162.
14. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *AM J Trop Med Hyg* 1940;20:471-92
15. Szalkai Teodóra Magyarországon előforduló Nyugat-Nílushi vírusfertőzések jelentősége és szeroepidemiológiai vizsgálata (Diplomamunka, 2008)

Karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok fenotípusos vizsgálata

Irodalmi áttekintés

Tóth Ákos

A Mikrobiológiai Körlevél 2010. évi 3. számában olvashattak az NDM-1 (New-Delhi Metallo- β -laktamáz) enzim első leírásáról, és világszintű megjelenéséről. Rolain és mtsai az NDM-ről szóló publikációjukban összefoglalták több pontban azokat a problémákat, amelyek a metallo- β -laktamáz-termelő *Enterobacteriaceae* családba tartozó törzsek terjedését megakadályozó intézkedések útjában állnak (1). Ezek közül az egyik igen fontos, hogy nincs standardizált fenotípusos kimutatási lehetőség a karbapenemáz termelésre.

Erre a problémára számos megoldást próbáltak kidolgozni az utóbbi években (pl. módosított Hodge-teszt, különböző inhibitorokkal kombinált korongos módszerek). Jelen írásban bemutatásra kerül Giske és mtsai-nak tanulmánya, mely a korábbi évek szakirodalmi tapasztalatai alapján kidolgozott, házilag is kivitelezhető fenotípusos tesztek érzékenységét és specificitását vizsgálta (elsősorban karbapenemáz-termelő *K. pneumoniae* izolátumok esetében) (2).

A vizsgálathoz jól jellemzett törzseket használtak:

- 34 KPC-típusú karbapenemáz-termelő *K. pneumoniae*
- 21 VIM-1-típusú MBL-termelő, és 3 IMP-típusú MBL-termelő *K. pneumoniae*
- 1 IMP-típusú MBL-termelő *E. coli*
- 9 OXA-48-típusú karbapenemáz-termelő *K. pneumoniae*
- 9 karbapenem rezisztens, de karbapenemáz-negatív *K. pneumoniae* (CTX-M-15 és/vagy SHV-típusú ESBL-termelők, melyek az Omp35 és/vagy Omp36 porin hiányos mutánsok voltak)
- 5 kromozómális AmpC-túltermelő *E. cloacae* ill. *E. aerogenes* (OmpF és/vagy OmpC porin hiányos mutánsok)

A vizsgálathoz alkalmazott fenotípusos módszerek:

- módosított Hodge-teszt (imipenem (10 μ g) koronggal) (*Szerzői megjegyzés: a CLSI 2010 ajánlásában meropenem vagy ertapenem korong szerepel erre a vizsgálatra*)
- kombinált korong teszt: **meropenem (10 μ g) + inhibitor. Inhibitorok: 1000 μ g dipikolinsav (DPA)/ 730 μ g etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)/ 600 μ g amino-fenil-boronsav (APB)/ 750 μ g cloxacillin.** Az első kettő inhibitor MBL-enzimek gátlószere (DPA, EDTA), az APB gátolja az AmpC-típusú β -laktamázok és a KPC-karbapenemázok működését, míg a cloxacillin az AmpC-típusú β -laktamázok kimutatására szolgál. Pozitív eredménynek tekintették, ha

≥5 mm gátlási zónaátmérő növekedést tapasztaltak EDTA, DPA és cloxacillin esetében, illetve ≥4 mm APB esetében.

- **Inhibitorral kombinált korongok elkészítése:** 10 µl került a korongokra inhibitoronként, és 30 percig hagyjuk száradni a korongokat a felhelyezés előtt.
- **Az egyes inhibitorok oldatainak elkészítése:** 100 mg/ml DPA (Sigma), 0,2M EDTA (Sigma), 60 mg/ml APB (Sigma), 75 mg/ml cloxacillin (Sigma). Fontos, hogy a DPA csak dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldható.

(Szerzői megjegyzés: korábbi publikációk alapján hasonló koncentrációban alkalmazzuk az inhibitorokat a fenotípusos vizsgálatok során a Referencia Laboratóriumban is)

- valamint kereskedelmi forgalomban kapható kombinált korong teszt, melyet a Rosco forgalmaz (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Dánia): meropenem, meropenem+DPA, meropenem+APB, meropenem+cloxacillin

A szakirodalomban korábban már publikált eredményekkel megegyezően az EDTA-val végzett vizsgálatok nem adtak kielégítő eredményt. A szakirodalomban korábban már publikált eredményekkel megegyezően az EDTA-val végzett vizsgálatok nem adtak kielégítő eredményt. Bár mind a 25 MBL-termelő törzsnél megfelelően működött a teszt, azonban néhány karbapenemáz-negatív (1/14) valamint karbapenemáz pozitív, nem-MBL-termelő törzs (8/43) esetében álpozitív eredményt adott. A DPA-val végzett vizsgálatoknál azonban csak az MBL-termelő törzsek adtak pozitív eredményt. A tesztek érzékenysége és specificitása az 1. és 2. táblázatban láthatók (Giske és mtsai tanulmánya alapján (2)).

1. táblázat Dipikolinsav (DPA), amino-fenil-boronsav (APB), cloxacillin illetve módosított Hodge-teszt érzékenysége és specificitása különböző β-laktamázok detektálásakor.

Teszt	β-laktamáz	Érzékenység (%)	Specificitás (%)
APB-pozitív, cloxacillin-negatív	KPC	100	98
APB-pozitív, cloxacillin-pozitív	AmpC*	80	100
EDTA-pozitív	MBL	100	88
DPA-pozitív	MBL	100	100
módosított Hodge-teszt	karbapenemázok (KPC, MBL, OXA-48)	100	77

*AmpC-túltermelés és porin vesztes kombinációja

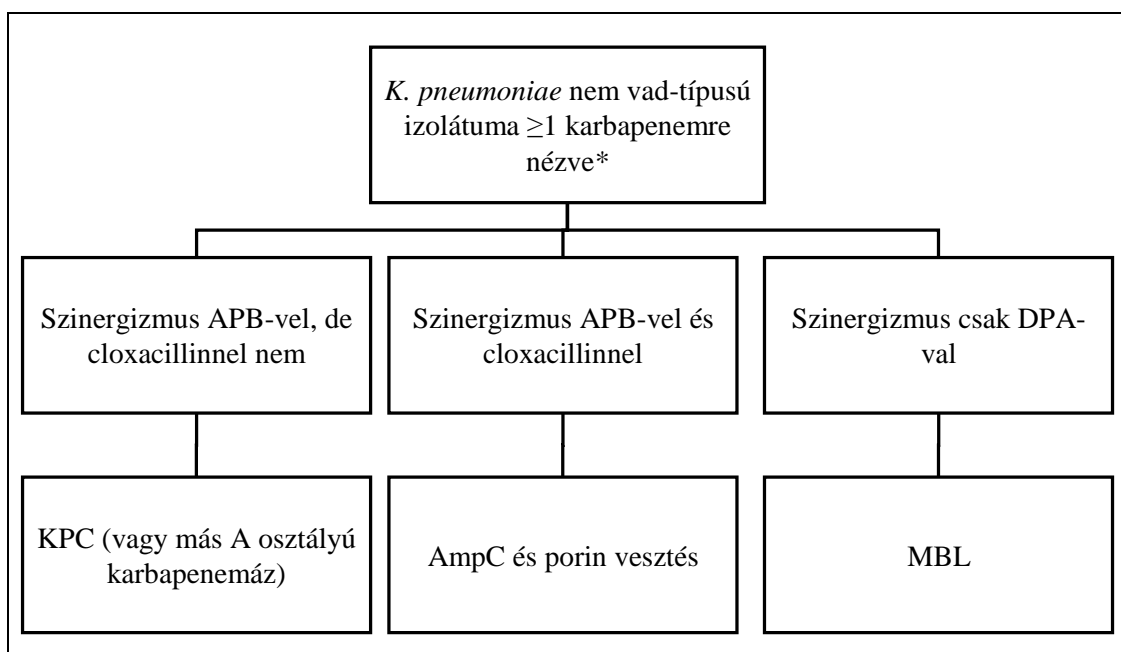
2. táblázat Rosco-féle kereskedelmi korong tesztek érzékenysége és specificitása a különböző β -laktamázok detektálásánál.

Teszt	β -laktamáz	Érzékenység (%)	Specificitás (%)
APB-pozitív, cloxacillin-negatív	KPC	100	98
APB-pozitív, cloxacillin-pozitív	AmpC*	40	100
DPA-pozitív	MBL	100	98

*AmpC-túltermelés és porin vesztes kombinációja

Az alkalmazott kombinált korong tesztek igen jó specificitást és érzékenységet mutattak, azonban fontos, hogy az eredmények megerősítésére molekuláris megerősítő vizsgálatok elvégzését javasolták. Az OXA-48 termelő törzsek pozitív eredményt mutathatnak mind APB, mind DPA inhibitorral is.

Az 1. ábrán pedig a szerzők által ajánlott algoritmus látható, mely a *K. pneumoniae* karbapenemáz termelésének vizsgálatához nyújt segítséget (2).



1. ábra Algoritmus a β -laktamáz inhibitorokkal végzett tesztek eredményének interpretálására *K. pneumoniae* esetében

APB: amino-fenil-boronsav, DPA: dipikolinsav, MBL: metallo- β -laktamáz. * EUCAST által meghatározott epidemiológiai cut-off feletti MIC érték

Fontos azonban megjegyezni, hogy különböző karbapenémázok együttes előfordulása, illetve azok megjelenése más β -laktámokra ható rezisztencia-mechanizmusokkal a fenotípusos vizsgálatok eredményének interpretálását jelentősen megnehezíthetik.

Felhasznált irodalom:

1. *Rolain JM, Parola P, Cornaglia G.* (2010) New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect.* doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03385.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20874758
2. *Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N.* (2010) A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20597925.

Karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok Magyarországon – az Országos Epidemiológiai Központ eredményei alapján

Tóth Ákos, Jánvári Laura, Ivelina Damjanova

A Mikrobiológiai Körlevél IX. évfolyam 1. és 3. számában már beszámoltunk az első karbapenemáz termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok magyarországi megjelenéséről. Jelen írásunkban röviden összefoglaljuk a 2008. január és 2010. október 1. között az Országos Epidemiológiai Központba (OEK) beküldött, karbapenemáz-termelőnek bizonyult *Enterobacteriaceae* izolátumokon végzett vizsgálatok eredményeit. Az 1. táblázatban a karbapenemáz-termelőnek bizonyult *Enterobacteriaceae* izolátumok évenkénti megoszlásban láthatók.

1. táblázat. Az OEK-ben megerősített, karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok száma évenkénti bontásban

	Karbapenemáz-termelő izolátumok száma az adott évben (járványhoz/halmozódáshoz tartozó izolátumok száma)		
	2008. év	2009. év	2010.01.01.-2010.10.01.
KPC-típusú karbapenemáz termelő			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (1)	8 (8)	1
VIM-típusú metallo-β-laktamáz (MBL)-termelő			
<i>K. pneumoniae</i>	-	1	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	2	40 (35)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	1
<i>Klebsiella. oxytoca</i>	-	1	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	1
<i>Citrobacter freundii</i>	-	1	1
<i>Serratia marcescens</i>	-	8 (8)	4 (3)
Összesen	1 (1)	21 (16)	50 (38)

A karbapenemáz-termelő izolátumok megerősítésére kombinált korong tesztelési módszereket (1), módosított Hodge-tesztet (2), valamint különböző β -laktamáz génekre tervezett PCR vizsgálatokat alkalmaztunk (1, 3, 4). Az izolátumok további vizsgálata során meghatároztuk *in vitro* antibiotikum érzékenységüket (ceftazidim, cefotaxim, imipenem, meropenem, ertapenem, colistin, tigecyclin, ciprofloxacín, amikacin, trimetoprim/sulfametoxazol), a hordozott karbapenemáz gén típusát, a karbapenemáz-gént hordozó I. osztályú integron szerkezetét, valamint egyes izolátumok esetében a lehetséges klonális

kapcsolatokat makrorestrikciós profilvizsgálattal (PFGE) és multi-lókuszos szekvencia tipizálással (MLST) (5).

Az eddig elvégzett vizsgálatok eredményeinek összefoglalása a 2. táblázatban látható. A táblázat a 2008-2009-ben beküldött, karbapenemáz-termelőnek bizonyult *Enterobacteriaceae* izolátumok mellett a 2010-ben lezajlott járványból származó VIM-4-típusú MBL-termelő *E. cloacae* izolátumok, és a 2010-ben izolált KPC-3-termelő *K. pneumoniae* izolátum vizsgálati eredményeit is tartalmazza. A többi (n=14) 2010-ben igazolt karbapenemáz-termelő izolátum vizsgálata jelenleg is folyik.

2009-ben az izolátumok többségét (8 KPC-2-termelő *K. pneumoniae*, 8 VIM-4-típusú MBL-termelő *S. marcescens*) az Észak-magyarországi régióból küldték megerősítésre, 2010-ben pedig egy budapesti kórház perinatális intenzív centrumában lezajlott járványból származott a legtöbb izolátum (35 VIM-4-típusú MBL-termelő *E. cloacae*).

A CLSI 2010. évi ajánlása szerint interpretálva az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredményeiről elmondhatjuk, hogy mindegyik vizsgált izolátum rezisztens volt ertapenemmel szemben, azonban imipenemmel és meropenemmel szembeni érzékenység már változatosabb képet mutatott. Egy *K. pneumoniae* izolátum mindkét utóbbi szerre *in vitro* érzékenynek bizonyult. A 3. generációs cefalosporinokkal szemben a legtöbb izolátum rezisztens volt, egy *S. marcescens* kivételével, mely *in vitro* érzékenynek bizonyult ceftazidimra (MIC 4 mg/L). Ciprofloxacinnal szemben az összes vizsgált *K. pneumoniae* izolátum magas szintű rezisztenciával rendelkezett, míg más specioseknél a fluoroquinolon rezisztencia ritkábban fordult elő. Aminoglikozidokkal szemben is változatos MIC értékekkel rendelkeztek a vizsgált izolátumok.

A multirezisztens, karbapenemekkel szemben is rezisztenciát mutató Gram-negatív kórokozók okozta fertőzések kezelésében előtérbe került antibiotikumok (colistin, tigecyclin) klinikai hatékonyságára az EUCAST ajánlása alapján következtethetünk (a CLSI ezekre nem ad meg breakpointokat). Az izolátumok többsége ≥ 2 mg/L MIC értékkel rendelkezett tigecyclinnel szemben. Mivel magas arányban fordult elő nem-érzékenység, ezért ajánlott MIC érték meghatározást végezni olyan esetekben, amikor tigecyclin terápia szóba jöhet.

A colistin esetében biztatóbb a helyzet, bár Magyarországon két járvány/halmozódást is okoztak magas szintű colistin rezisztenciával rendelkező törzsek: egyik esetében (*S. marcescens*) természetes, míg a másokban (*K. pneumoniae*) szerzett rezisztencia volt.

KPC-típusú karbapenemázokat eddig csak *K. pneumoniae* izolátumokban azonosítottunk. Az első KPC-2-pozitív izolátum (amely végül 3 intézményt és 7 beteget érintő járványt okozott) és a KPC-3-pozitív *K. pneumoniae* izolátum is importált esetből származott. A KPC-típusok földrajzi megoszlására jellemző, hogy a KPC-2 Görögországban, míg a KPC-3 az USA-ban és Izraelben domináns típus (6, 7). A hazai izolátumoknál is ennek megfelelően a KPC-2-pozitív esetenél görögországi kapcsolat, míg a KPC-3-pozitív esetenél USA-beli (New York) kapcsolat volt bizonyítható.

A KPC-típusú karbapenemázokkal szemben VIM-típusú MBL-t eddig hét különböző speciesből mutattunk ki. A már megvizsgált, 2009-ből és 2010-ből származó izolátumok (2. táblázat) mindegyikében a *bla*_{VIM-4} gént azonosítottuk, mely különböző szerkezetű I. osztályú integronokon helyezkedett el (1. ábra).

Jelenlegi tapasztalataink alapján, Magyarországon az *Enterobacteriaceae* izolátumokban előforduló KPC-típusú és VIM-típusú karbapenemázok mobilizációja és terjedése eltér egymástól. Míg a 9 KPC-2-termelő törzsek egyetlen species egyetlen genetikai klónjához (S PFGE típus) tartoztak, addig *bla*_{VIM-4} gén 5 különböző speciesben fordult elő! Külön ki kell emelni a *bla*_{VIM-4} gént hordozó **Int1/A(6-Ib)V(4)** jelölésű I. osztályú integron (1. ábra) azonosítását három különböző speciesben (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca* és *E. cloacae* (3 eltérő PFGE-típus)) (2. táblázat). Ezt az integront Libisch és mtsai korábban már leírták Magyarországon *Pseudomonas aeruginosa* és *Aeromonas hydrophila* törzsekben is (8, 9). Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a VIM-4-típusú karbapenemázok terjedése speciesek-közötti horizontális átvitel eredménye, és felmerül a környezetben előforduló baktériumok génállományának („genetikai-pool”) szerepe is.

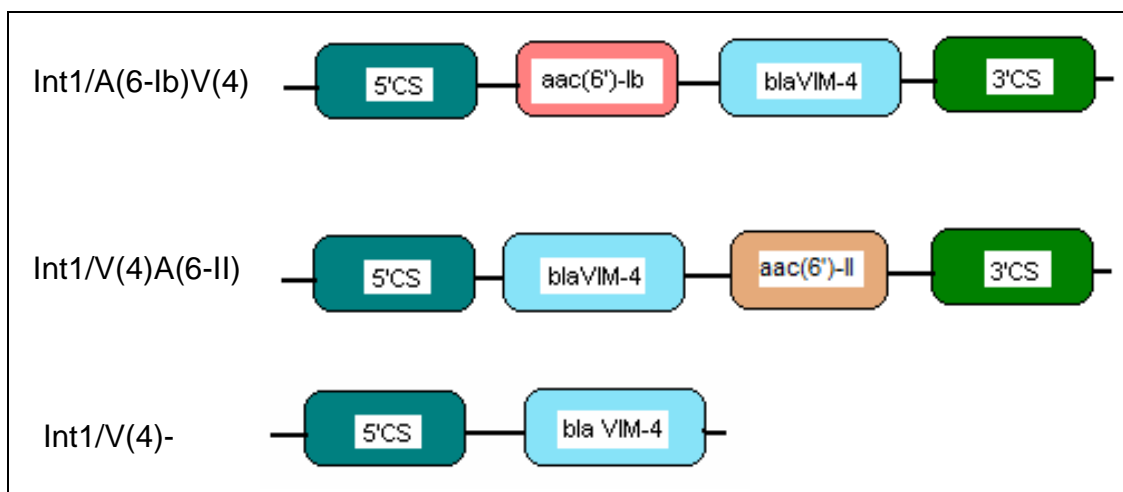
A molekuláris epidemiológiai vizsgálatok további összefüggésekre is rávilágítottak. A VIM-4 (és CTX-M-15) termelő, valamint a 9 KPC-2 termelő *K. pneumoniae* izolátum PFGE vizsgálata 88%-os hasonlóságot igazolt, a 2005-ben leírt 33 CTX-M-15-termelő S epidémiás klónhoz és ST11 szekvencia típusba tartozó törzsekkel (2. ábra). Az MLST vizsgálat alapján a kétféle karbapenemáz termelő törzs különböző, de egymással nagyon közeli rokonságban (ún. SLV – egy lókuszt különbség) álló ST-kba tartoztak. A KPC-2-termelő törzsek az ST258 tagjai, a VIM-4 és a CTX-M-15-termelő törzsek pedig az ST11 tagjai.

Az utóbbi egy évben publikált nemzetközi vizsgálatok alapján a KPC-2 és KPC-3-termelő ST258 *K. pneumoniae* klón a világ számos országában elterjedt (6, 7), míg az ST11 Kínában a domináns KPC-2-termelő *K. pneumoniae* klón (10), és a domináns ESBL-termelő klón Koreában (11). Ezen megfigyelések alapján valószínűsíthető egy multirezisztens *K. pneumoniae* hiperepidémiás klonális komplex – CC258 – robbanásszerű, világméretű térhódítása (1, 10).

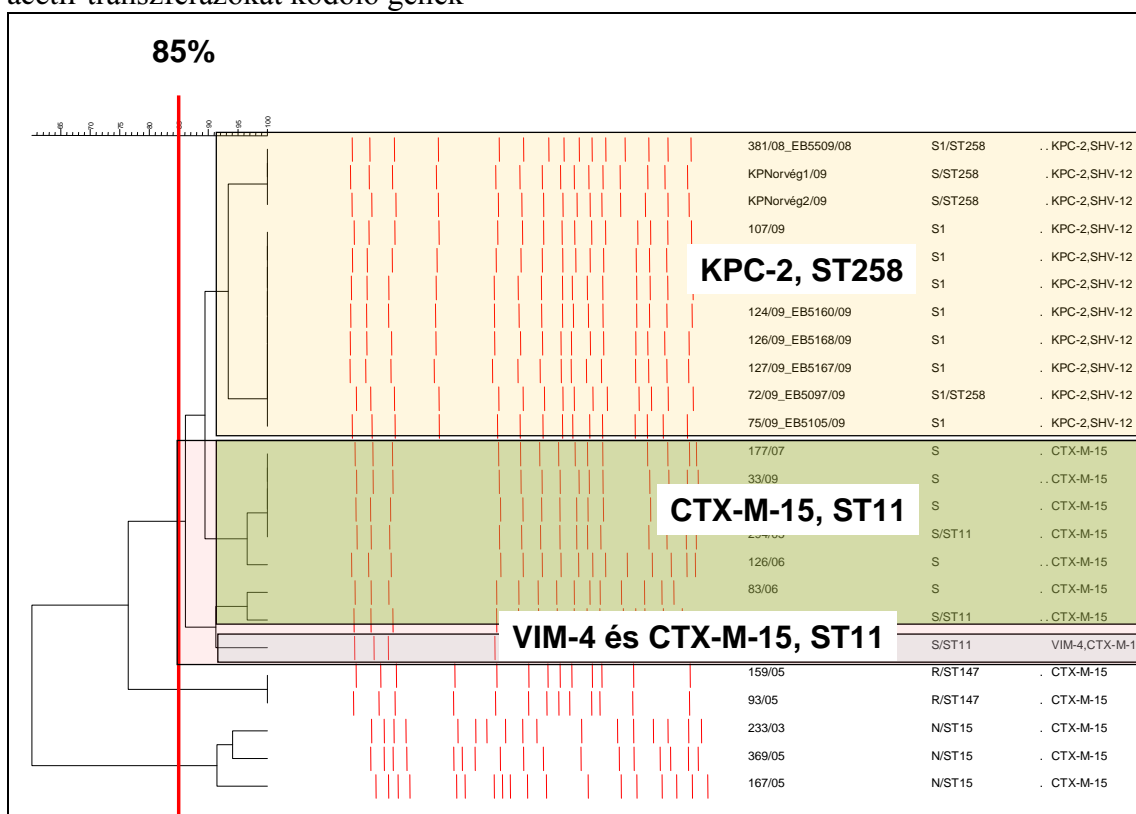
2. táblázat Néhány kiválasztott, karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátum β -laktamáz hordozása és antibiotikum érzékenysége

Species	Izolálás éve (Megye-Centrum)	Karbapenemáz típusa	Karbapenemáz- gént hordozó I osztályú integron	ESBL- típus	PFGE- típus (Szekvencia típus)	Antibiotikum MIC értéktartomány (mg/L)										
						IMP	MEM	ETP	CAZ	CTX	COL	TGC	CIP	GEN	AK	SXT
<i>K. pneumoniae</i>	2008 (BAZ-A)	KPC-2	negatív	SHV-12	S klón (ST258)	16	8	8	>256	256	0,5	2	>32	4	64	>32
<i>K. pneumoniae</i> (n=8)	2009 (BAZ-A, B, C)	KPC-2*	negatív	SHV-12*	S klón (ST258)	32- >32	8-16	8-32	>256	64- 256	16- 64	2-4	>32	2-4	64	0,5
<i>C. freundii</i>	2009 (BK-A)	VIM-4	IntI/V(4)-	CTX-M-15	NM	8	4	4	>256	>256	0,125	4	>32	>256	32	>32
<i>K. oxytoca</i>	2009 (BP-A)	VIM-4	IntI/A(6-1b)V(4)	negatív	NM	2	1	2	64	64	1	2	2	2	16	0,5
<i>K. marcescens</i> (n=8)	2009 (BAZ-A)	VIM-4*	IntI/V(4)A(6-II)*	negatív	SM005	>32	2-8	32	4-16	32- 64	>256	4	0,5	1	2	0,25
<i>E. cloacae</i>	2009 (BP-B)	VIM-4	IntI/A(6-1b)V(4)	negatív	EbC019	8	1	4	>256	>256	2	8	>32	2	32	1
<i>E. cloacae</i>	2009 (F-A)	VIM-4	IntI/A(6-1b)V(4)	CTX-M-15	NM	4	0,5	16	>256	>256	1	4	8	128	8	>32
<i>K. pneumoniae</i>	2009 (BP-C)	VIM-4	IntI/A(6-1b)V(4)	CTX-M-15	S klón (ST11)	0,5	0,25	2	32	64	0,5	1	>32	>256	16	>32
<i>K. pneumoniae</i>	2010 (SZSZB-A)	KPC-3	negatív	NM	KP065	>32	8	>32	>256	256	1	1	>32	4	16	>32
<i>E. cloacae**</i>	2010 (BP-D)	VIM-4	IntI/A(6-1b)V(4)	SHV-12	EbC038	8	0,5	16	128	128	1	2	0,125	64	16	NM
<i>E. cloacae**</i>	2010 (BP-D)	VIM-4	IntI/A(6-1b)V(4)	negatív	EbC038	16	1	32	64	128	1	2	1	64	16	NM

IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, ETP: Ertapenem, CAZ: Ceftazidim, CTX: Cefotaxim, COL: Colistin, TGC: Tigecyclin, CIP: Ciprodolaxim, GEN: Gentamicin, AK: Amikacin, SXT: trimethoprim/sulfametoxazol, NM: Nincs meghatározva; * Egy PFGE-típusba tartozó több izolátum esetében 2 kiválasztott törzsnél határoztuk meg a hordozott karbapenemáz, ESBL és integron-típust; ** Egy PFGE-típus (EbC038) tartozó és egy járványból származó izolátumok (32 klinikai izolátum (21 beteg) illetve 3 környezeti izolátum), eből 127 SHV-12-típusú ESBL-termelő izolátum



1. ábra Magyarországon izolált MBL-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumokban előforduló VIM-4-típusú β -laktamáz gént hordozó integronok szerkezete. 5'CS, 3'CS: Az integron 5' és 3' konzervatív régiója; aac(6')-Ib, aac(6')-II: aminoglikozid-acetil-transzferázokat kódoló gének



2. ábra Kilenc KPC-2-termelő, 7 CTX-M-15-termelő és a VIM-4, CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* törzsek makrorestrikciós profilanalízise (PFGE vizsgálat) és szekvencia típusai (ST) (S klón)

Köszönjük a bakteriológiai diagnosztikai laboratóriumokban dolgozó kollégáknak, hogy az izolátumok beküldésével eddig is segítették munkánkat! Kérjük, hogy az olyan *Enterobacteriaceae* izolátumokat, melyek valamelyik karbapenemre nézve rezisztens/mérsékeltlen érzékeny fenotípust mutat (CLSI 2010. évi vagy EUCAST ajánlása

alapján), illetve módosított Hodge-teszt vizsgálattal pozitív, az OEK Bakteriológiai I. osztályára további vizsgálatra és megerősítésre beküldeni szíveskedjenek!
Irodalomjegyzék

1. Tóth Á, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J. (2010) Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29: 765–767.
2. Tóth Á. (2009) A karbapenem rezisztens *Klebsiella pneumoniae*: Irodalmi összefoglalás és az első hazai izolálások eredményei. *Mikrobiológiai Körlevél*, 9: 1. sz.
3. Kristóf K, Tóth Á, Damjanova I, Jánvári L, Konkoly-Thege M, Kocsis B, Koncan R, Cornaglia G, Szegő E, Nagy K, Szabó D. (2010) Identification of a *bla_{VIM-4}* gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. *J Antimicrob Chemother*. 65:1303-1305.
4. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. (2007) *J Antimicrob Chemother*. 59: 321-322.
5. Damjanova I, Tóth Á, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M. (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSA’s’? *J Antimicrob Chemother*. 62: 978-985.
6. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Tóth Á, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y, the CNSE Working Group. (2010) Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurv*. 46. 2010. november 18.
7. Kitchel B, Rasheed JK, Batel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. (2009) Molecular Epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258.
8. Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minárovits J, Knausz M, Watine J, Ternák G, Kenéz E, Kustos I, Rókusz L, Széles K, Balogh B, Füzi M. (2006) Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary. *Antimicrob Agents Chemother*. 50: 4220-4223.
9. Libisch B, Giske CG, Kovács B, Tóth TG, Füzi M. (2008) Identification of the first VIM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. *J Clin Microbiol*. 46: 1878-1880.
10. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. (2010) ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*. Doi:10.1093/jac/dkq431
11. Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, Yeom JS, Kim YS, Jung SI, Shin SY, Heo ST, Kwon KT, Son JS, Kim SW, Chang HH, Ki HK, Chung DR, Peck KR, Song JH. (2010) Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol*. 59: 822-828.