



Mikrobiológiai Körlevél

Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ
Bakteriológiai, Mikológiai, Parazitológiai és Tipizáló
Főosztály

2004. 4. évfolyam 1. szám

Tartalom:

A legionellózis diagnosztikája

A Lyme betegség laboratóriumi diagnosztikájáról

Mycoplasma pneumoniae és *Chlamydia pneumoniae* fertőzések
szerodiagnosztikája

A *Bordetella pertussis* által okozott légúti infekció diagnosztikája

Néhány újabb szempont az ESBL termelés vizsgálatához

Az invazív A csoportú *Streptococcus* (GAS)
(*Streptococcus pyogenes*) molekuláris tipizálásának bevezetése,
mint a hazai surveillance kialakításának első lépése

A legionellózis diagnosztikája

A legionellózis 1998 óta Magyarországon is kötelezően bejelentendő betegség. A 90-es évek második felétől a mikrobiológiai diagnosztika fejlődésének és az új módszerek bevezetésének köszönhetően egyre több *Legionella* okozta fertőzést diagnosztizálnak hazánkban is. Jelen munkában ismertetjük az Országos Epidemiológiai Központ *Legionella* Nemzeti Referencia Laboratóriumában rutinszerűen alkalmazott eljárásokat, és az azokkal kapott eredményeket.

Magyarországon az első, – utólag igazolt – *Legionella* okozta megbetegedés 1979-ben történt (1). 1980-ban halálos kimenetelű legionellózisról számoltak be Szalka és munkatársai (2). Az első bizonyított *Legionella* járvány 1983-ban (3), míg a második 1987-ben zajlott. A fertőző forrás egy katonai létesítmény légkondicionáló berendezésének a nedves mosókamrája volt (4).

Ezután hosszú ideig nem regisztráltak újabb *Legionella* okozta fertőzést. Közel tíz évig tartotta magát az a nézet, hogy Magyarországon azért nincs legionellózis, mert nincsenek, vagy csak elvétve vannak légkondicionáló berendezések. A kilencvenes évek elejétől azonban a légkondicionálók használata rohamosan terjedt. Ekkor úgy gondolták, hogy mivel a nálunk alkalmazott klímaberendezések nem párasítanak, így legionellák okozta fertőzésekkel továbbra sem kell számolni. Az évtized végére azonban ismertté vált, hogy a légkondicionálókon kívül fontos fertőző forrásként szerepelhetnek a háztartási (használati) melegvízrendszerek, és más eszközök, berendezések (hűtőtornyok, szőkőkutak, szobaszőkőkutak, szobai pezsgőfürdők, szobai párasítók, stb.) is, melyekben a legionellák elszaporodhatnak, és aeroszollal a levegőbe juthatnak. A nem párasító légkondicionáló berendezésekről is kiderült, hogy okozhatnak fertőzést, ha nem megfelelő a kondenzvíz tároló kivitelezése, és karbantartását, tisztítását elhanyagolják (5). A 90-es évek közepétől a *legionella* fertőzések hazai diagnosztikája jelentős fejlődésnek indult, és ennek köszönhetően 1997-től növekedett a legionellózis kimutatását célzó laboratóriumi vizsgálatok, és ezzel párhuzamosan az igazolt esetek száma is.

1. táblázat a lehetséges fertőző forrásokat ismerteti.

Lehetséges fertőző források:

- légkondicionáló berendezések
- épületek hideg- és melegvízrendszerei (mosdók, zuhanyzók)
- hűtőtornyok
- szőkőkutak
- párasító berendezések
- pezsgő (élmény) fürdők
- kertí locsolók

1. Táblázat: Leggyakoribb fertőző források

Diagnosztikus lehetőségek hazánkban.

A *Legionella* laboratóriumi diagnosztizálására sokféle módszer áll rendelkezésünkre (6,7,8). Az alábbiakban az Országos Epidemiológiai Központ *Legionella* Nemzeti Referencia Laboratóriuma által rutinszerűen végzett vizsgálatokat, a velük kapott tapasztalatainkat és eredményeinket ismertetjük.

1. A baktérium vagy antigénjének direkt kimutatása klinikai mintákból

• Direkt immunfluoreszcens festés (DIF)

A vizsgálatra bármilyen légúti minta, ill. szekciós anyag alkalmas, de tapasztalataink szerint legbiztosabb eredményt a szakszerűen kivitelezett bronchoalveoláris lavage (BAL) és a védett BAL ill. mini BAL (6) vizsgálata nyújt. A jó minőségű alsólégúti köpet is jó hatásfokkal vizsgálható (9, 10, 11).

A betegség kezdetétől számított egy-két nap múlva a kórokozó már kimutatható a légúti mintákból. A módszer előnye, hogy már a betegség korai szakaszában sikerrel alkalmazható, gyors eredményt ad (a vizsgálat és értékelése órák alatt elvégezhető), valamint a betegség kezdetekor alkalmazott antibiotikum-terápia a kimutathatóságot lényegesen nem befolyásolja. Hátránya, hogy a vizsgálat és az értékelés mikroszkóposan történik.

Az irodalom szerint egyes – a száj- és garatflórában normálisan meglévő – baktériumok (pl.: *Bacteroides*) keresztreakciót adhatnak. Ilyen, zavaró keresztreakciót saját vizsgálataink során eddig nem tapasztaltunk.

A *Legionella pneumophila* mind a 14 szerotípusa (a legújabb 15-ös szerotípus felismerésére még nem ismerünk kereskedelmi forgalomban kapható tesztet), valamint az öt leggyakoribb egyéb *Legionella* species kimutatható ezzel a módszerrel.

• **A kórokozó szolubilis antigénjének kimutatása vizeletből Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) – módszerrel**

A legionellák oldékony (szolubilis) antigénje a fertőzést követően igen hamar (1-6 nap) megjelenik a vizeletben. Egyes irodalmi adatok szerint sokáig (esetenként több hónapig) is kimutathatók. Tapasztalatunk szerint azonban a betegség kezdetétől számított 4-6 nap után általában eltűnik az antigén a vizeletből.

A módszer előnye, hogy a betegség korai szakaszában alkalmazható, zavaró keresztreakció nem ismeretes. Az ELISA- módszer kivitelezése és értékelése jól automatizálható. Egy napon belül eredményt ad.

• **A kórokozó szolubilis antigénjének kimutatása vizeletből mikro-immunokromatográfiás módszerrel**

E vizsgálati eljárásra is vonatkoznak az ELISA- módszernél leírtak. Lényeges különbség azonban, hogy semmilyen berendezést nem igényel (ELISA-leolvasó, mikroszkóp, stb.) és 15-20 perc múlva leolvasható az eredmény. Hátránya, hogy csak a *L. pneumophila* 1-es szerotípusra igazán érzékeny. (Külföldi adatok szerint ezen szerotípus felőlős a *Legionella* fertőzések 75-90%-áért.)

• **(PCR-próba)**

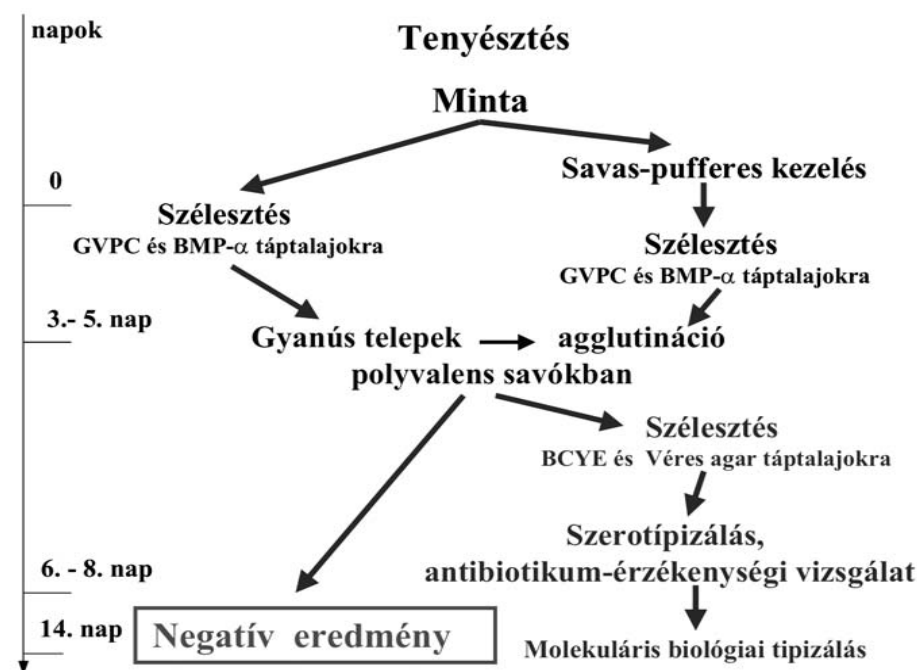
A módszer jelenleg már rutinszerűen is alkalmazható, de költségessége miatt csak indokolt esetben javasolt.

• **Tenyésztés légúti mintákból**

Ez a módszer ad legbiztosabb választ arra, hogy a beteg valóban legionellózisban szenved-e vagy sem. Tenyésztésre szinte bármilyen minta alkalmas (szövet, köpet, bronchus váladék, pleurapunktátum, BAL, transztracheális aspirátum, különféle bronchoszkópos minták, hemokultúra, boncanyag, stb.). Eddigi tapasztalataink alapján a megfelelően vett BAL, és a védett mini BAL *Legionella* diagnosztika szempontjából alkalmasabb,

mint a védett kefés mintavétel. Párhuzamosan vett védett kefés és BAL mintákat feldolgozva, a DIF-el és/vagy tenyésztéssel pozitív BAL minták védett kefés párja minden esetben negatív eredményt adott.

Tenyésztéssel az összes *Legionella* species és szerotípus kimutatható! A tenyésztés hátránya, hogy leghamarabb 3 nap múlva ad eredményt és kétféle (GVPC és BMP-a) táptalajra kell egy időben, savas pufferes kezelés előtt és után feldolgozni. Az adekvát antibiotikum terápia, valamint az epidemiológiai vizsgálatok, az izolátumok molekuláris biológiai jellemzése érdekében azonban a tenyésztés nélkülözhetetlen.



1. ábra: A tenyésztés menete

Az izolátumok szerotípezálása DIF, vagy LATEX agglutinációval történhet.

2. **A kórokozó ellen termelődő ellenanyagok (IgA, IgM, IgG) kimutatása**

Jelenleg rutinszerűen csak IgG típusú ellenanyag kimutatását végezzük. Az IgA és IgM típusú ellenanyagok kimutatására alkalmas tesztek kipróbálása folyamatban van.

Az IgG- típusú ellenanyagok a betegség kezdetétől számított 12-14. napon jelennek meg leg-

korábban. A fertőzés átvészélése után sokáig (akár egy-két évig is) fennmaradhat a magas ellenanyag titer /1:128/. Ezért egyszeri magas ellenanyag szint önmagában még nem jelent feltétlenül legionellózist, savópár vizsgálata esetén négyszeres titer emelkedést tekintünk diagnosztikusnak. A lakosság átfertőzöttségével is számolnunk kell. Erre vonatkozóan külföldön 1-16%-os adatot közöltek (8, 12). A hazai felmérés szerint ez – tesztől függően – 10-14 %.

• Indirekt immunfluoreszcens módszerrel (IFA)

A módszer leolvasása mikroszkóposan történik, így az értékelés nagy gyakorlatot igényel. A kereskedelemben számos tesztkészítmény kapható. A legtöbb teszt csak a *L. pneumophila* 1-es, ill. a *L. pneumophila* 1-6-os szerotípusok kimutatására alkalmas. Laboratóriumunkban a *L. pneumophila* mind a 14 szerotípusa, valamint az öt leggyakoribb egyéb *Legionella* species kimutatására alkalmas készítményt használunk.

• Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-módszerrel

A módszer előnye elsősorban az automatizálhatóságában, valamint abban rejlik, hogy a nagy gyakorlatot igénylő mikroszkópizálást kiváltja.

Több gyári készítmény van forgalomban. Nagyon fontos, hogy az alkalmazott teszt a *L. pneumophila* összes szerotípusa ellen termelődött ellenanyagot ki tudja mutatni!

A korrekt bakteriológiai diagnózis érdekében célszerű többféle módszert együttesen alkalmazni, mivel alkalmazhatósági időintervallumuk különböző (lásd 2. Ábra).

Napok száma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Tenyésztés																
Antigén kimutatás köpetből, BAL-ból (DIF)																
Antigén kimutatás vizeletből																
Ellenanyag kimutatás vérből (IgG)																

2. ábra: Az egyes diagnosztikus eljárások időbeni alkalmazhatósága a *Legionella* fertőzés alatt.

Az 2. ábrán látható hogy a korrekt diagnózishoz, legalább az első alkalommal háromféle minta, légúti váladék, – amennyiben lehet, BAL, vizelet, és vérsavó szükséges.

A tenyésztés során kapott kevés pozitív eredményt magyarázhatja, hogy a laboratóriumba nagyrészt a területen antibiotikum terápiában már részesített betegek mintája került. Az antibiotikum terápia - még a nem megfelelő antibiotikumok adása is – nagymértékben csökkenti a legionellák kitenyészthetőségét.

A legionellózis 1998-tól kötelezően bejelentendő fertőző betegség. Az 1998-as évben 19 beteget jelentettek be, míg 1999-ben a bejelentett esetek száma 35 volt (14). Az 1999-ben bejelentett 35 *Legionella* gyanús esetből 27 esetet a laboratóriumi vizsgálatok is megerősítettek (OEK Járványügyi Osztálya adatai alapján). 2003-ra a bejelentett esetek száma 124-re emelkedett.

Évek	Megbetegedése		Halálozások száma	Letalítás %
	Száma	%		
1998	18	0,2	0	0
1999	27	0,3	4	14,8
2000	42	0,4	5	11,9
2001	55	0,5	6	14,3
2002	65	0,6	3	5
2003*	124	1,2	?	?

*Nem tisztított adatok

1. táblázat: Elfogadott bejelentett megbetegedések

A korcsoport szerinti megoszlás 2. táblázat szerint az alábbiak szerint alakult 1999-ben:

korcsoport / év /	az esetek szám	arány / % /
0 – 15	12	11,8
16 – 30	36	35,3
31 – 45	19	18,6
46 – 60	14	13,7
61 -	21	20,6
Összesen	102*	100

* 1 beteg életkora ismeretlen.

2. táblázat: A pozitív esetek korcsoport szerinti megoszlása 1999-ben.

Az elmúlt években is hasonlóan alakult a betegek korcsoport szerinti megoszlása.

A kapott pozitív eredmények módszerek szerinti megoszlását a 3. táblázat tartalmazza.

Évek	Ellenanyag kimutatás (IgG)		Antigén kimutatás vizeletből		Antigén kimutatás légúti mintából (DIF)		Tenyésztés légúti mintából	
	Összes mint a	Pozitív mint a	Összes mint a	Pozitív mint a	Összes mint a	Pozitív mint a	Összes mint a	Pozitív mint a
1997	471	29 (6%)	---	---	3	1	2	1
1998	529	60 (11%)	43	4	23	9	23	3
1999	708	112 (12%)	70	3	76	27	76	2
2000	700	104 (15%)	55	3	68	26	59	3
2001	945	168 (18%)	57	5	103	32	103	5
2002	988	145 (15%)	119	7	84	14	84	2
2003	1214	326 (27%)	157	5	100	60	100	0

3. táblázat: A pozitívítás megoszlása módszerek szerint

A külföldi közlemények szerint a környezeti és a klinikai minták jelentős részéből (80-99%) a *Legionella pneumophila* 1-es szerotípusa tenyészthető, ill. mutatható ki, a *L. pneumophila* többi 13 szerotípusa, valamint az egyéb *Legionella* speciesek csak ritkán (7, 14). Ezeknek az adatoknak az OKK OKI Vízhigiénés Osztályával több éve folytatott közös vizsgálataink eredményei ellentmondanak. Az OKI Vízbakteriológiai Laboratóriumával közösen több ételmeiszteri és egyéb üzem vízrendszerét, hűtőtornyát, három budapesti szálloda légkondicionálóját, vízrendszerét és négy budapesti kórház intenzív, ill. sebészeti osztálya haszná-

lati vízrendszerét vizsgáltuk. Néhány megbetegedés kapcsán légkondicionált munkahelyek klímaberendezéseit is mintáztuk. Ezen vizsgálatainkból, valamint a klinikai mintákból származó legionellák szerotipizálása eredményeképpen úgy tűnik, hogy hazánkban a leggyakoribb szerotípus a klinikai, valamint a környezeti mintákban a *L. pneumophila* 3-as. A *L. pneumophila* 1-es szerotípussal környezeti mintákban eddig csak elvétve találgottunk. A klinikai minták vizsgálatához a kereskedelemben kapható *Legionella* tesztek közül sok csak a *L. pneumophila* 1-es szerotípust mutatja ki. Így félt, hogy e tesztek használva a hazai *Legionella* infekciók egy részét nem sikerül diagnosztizálni.

A klinikai és a környezeti mintákból kitenyésztett legionellák több mint fele in vitro rezisztensnek bizonyult ciprofloxacinnal szemben, de előfordult néhány esetben erythromycin és rifampicin rezisztens izolátum is (e három antibiotikummal szembeni együttes rezisztenciát eddig még nem tapasztaltunk). A levofloxacinrel kapott eredményeink még szegényesek. Az eddigi adatok azt mutatják, hogy a hazai mintákból izolált *Legionella* törzsek antibiotikum érzékenysége igen eltérő lehet. A helyes antibiotikum terápia megvalósítása érdekében fontos lenne minél nagyobb számú hazai izolátumra vonatkozó antibiotikum-rezisztencia adatokkal rendelkezni. Ezt azonban nehezíti a területen alkalmazott – gyakran nem megfelelő – antibiotikumok adása, lehetetlenné téve így a legionellák izolálását és további vizsgálatukat.

Köszönet illeti e munka elkészüléséhez nyújtott segítségéért: Dr. Kádár Mihály főosztályvezető főorvost (OKK OKI Vízhigiénés Főosztály), Dr. Csohán Ágnes osztályvezető főorvost (OEK Járványügyi Osztály) és Kaszás Katalint (OEK Járványügyi Osztály).

Bognár Csaba
Varga Aranka
Kalácska Judit

Irodalom

1. Hutás I., Fodor T., Falus F., és mtsai: Súlyos acut pneumoniás beteg savójában talált légiós betegség ellenanyagtitel emelkedés. *Orv. Hetil.* 122, 501, 1981.

2. Szalka A., Marton A., Kálnai Zs., és mtsai: Halálos kimenetelű legionellózis. *Orv. Hetil.* 40, 2463-2469, 1981.
3. Mosonyi J., Alberti E., Gyarmathy J., és mtsai: Legionella fertőzés: az atipusos pneumóniák egyik lehetséges oka. *Orv. Hetil.*: 30, 1803-1806, 1984.
4. Bognár Cs., Herendi Á., Senoner Zs. és Ivócs J.: Legionellózis. *Budapesti Közegészségügy* 26, 52-55, 1994.
5. Kádár M., Bognár Cs., Miskovics E.: Legionellozis. Összefoglaló jelentés a Bankcenter üzletházban (Budapest) dolgozó alkalmazott legionellosis megbetegedése kapcsán történt helyszíni minták vizsgálati eredményeiről. *Epinfo*, 401-403, 1999.
6. Nagy Erzsébet: Baktériumok okozta atipusos pneumóniák és laboratóriumi diagnosztikájuk lehetőségei. *Háziorvos Továbbképző Szemle*, 4, S42-S46, 1999.
7. Czirik Éva (szerk.): Klinikai és járványügyi bakteriológia. In: Bognár Csaba: Legionella. (pp. 438-441), Melania, Budapest, 1999.
8. Collier L., Ballows A., Sussman M (eds.): Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections (9th ed.), Arnold, London, 1997.
9. Senoner Zs., Szabó N.: Mély légúti bakteriális infekciók diagnosztikája. *Háziorvos Továbbképző Szemle*, 52, 388-389, 1999.
10. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C.: Manual of Clinical Microbiology (7th ed.), ASM Press, Washington D.C., 1999.
11. Isenberg H.D.(ed.): Clinical Microbiology Procedures Handbook, ASM Press, Washington D.C., 1995.
12. Cunha B.A. (ed.): Legionnaires' Disease, *Semin. Respir. Infect.*, 13, 83-164, 1998.
13. Weekly Epidemiological Record; Legionnaires' disease in Europe, 1996, World Health Organization, Geneva, 72, 253-260, 1997.
14. 1999-ben bejelentett fertőző betegségek. *Epinfo*, 51-52, 2000.

A Lyme betegség laboratóriumi diagnosztikájáról

A Lyme borreliozis igazolására kért laboratóriumi vizsgálatkérések száma évről-évre emelkedik. Sok betegnél nem specifikus klinikai tünetek (gyengeség, fejfájás, myalgia, arthralgia) tisztázása miatt kéri a vizsgálatot. Ilyen esetekben, a pozitív eredmények prediktív értéke a klinikai értékelhetőség szempontjából alacsony. Mind a betegek érdekei, mind gazdaságossági szempontok az ilyen vizsgálatok számának visszaszorítását indokolják. Jobban körül kell határolnunk tehát, hogy milyen esetekben indokolt a laboratóriumi vizsgálat elvégzése.

A CDC elsősorban epidemiológiai surveillance célra szánt betegségdefiníciót állított fel [1]. Eszerint, Lyme betegség igazoltnak tekinthető olyan személynél:

1. aki kezelőorvosánál ECM típusos tüneteivel jelentkezik; vagy
2. a) akinek tünete (bőr, ízületi, neurológiai vagy cardialis) legalább egy késői manifesztációval kompatibilisek; és
b) akinél a fertőzés ténye laboratóriumi vizsgálatokkal megerősítést nyer.

A fenti definíció alkalmazása nem célozza 100%-os specifitás és szenzitivitás elérését a klinikai diagnosztikában, de megfelelő kiindulási pont a differenciáldiagnosztika és surveillance számára, továbbá kiemeli a laboratóriumi vizsgálatok szerepét, különösen az extracután manifesztációk diagnosztikájában.

Hasonló értelemben foglal állást az EUCALB [2] esetdefiníciói felállításánál.

A laboratóriumi vizsgálat elvégzésével járó előny mérlegelése

Hangsúlyozandó, hogy a Lyme borreliozis alapvetően klinikai diagnózis. A klinikai adatok (anamnézis, tünetek, fizikális vizsgálat) a diagnózis felállításának és a laboratóriumi leletek értékelésének döntő faktorai. Mindazonáltal, a laboratóriumi tesztek eredménye alátámaszthatja vagy cáfolhatja a diagnózist. Mikrobiológiai vizsgálat kérése olyan esetekben indokolt, amikor a Lyme kór gyanúja megalapozott [azaz, a betegség teszt előtti valószínűsége (ún. „pretest probability”) >0,2].

Amennyiben az expozíció lehetősége és a klinikai tünetek alapján a *pretest probability*

>0,2, a laboratórium a spirocheta izolálásával (szövetből, testnedvből vagy liquorból), vagy diagnosztikus szintű, specifikus IgM vagy IgG válasz kimutatásával (szérumból vagy liquorból) támaszthatja alá a *B. burgdorferi* fertőzés gyanúját.

A konszenzus kialakítása és a klinikussal történő konzultáció határfokának növelése érdekében a laboratóriumi szakembernek is tudatában kell lennie a következőknek.

A klinikus annak eldöntéséhez kéri a laboratórium segítségét, hogy kezdjen-e Lyme borreliosis miatt antibiotikum-kezelést a betegnél. Az alábbi táblázatban azt kívánjuk szemléltetni, hogy a laboratóriumi vizsgálat eredménye a betegség teszt előtti valószínűségének függvényében miként befolyásolhatja a klinikus döntését.

„Pretest probability”	A vizsgálat elvégzésével járó nyereség
>0,8: A tünetek alapján többé-kevésbé biztosan felismerhető a betegség (például ECM)	Csekély – a klinikus döntését az eredmény valószínűleg nem befolyásolja
körülbelül 0,5: A klinikus nagyjából 50%-ban biztos a diagnózis helyességében	A vizsgálat eredménye jelentős segítséget nyújt a dilemma valamilyen irányú eldöntéséhez
<0,2: A klinikus aspecifikus, bizonytalan tünetek alapján kéri a vizsgálatot	Csekély – a negatív szerológiai eredmény késői esetben nagy biztonsággal kizárja, de az esetleges pozitív eredmény csak igen kis mértékben növeli a betegség fennállásának valószínűségét

1. táblázat

Összefoglalva:

1. Minél kevésbé specifikusak a tünetek, annál kisebb a Lyme borreliosis valószínűsége, ennek megfelelően, annál kisebb a szerológiai vizsgálat eredményének pozitív prediktív értéke.

2. Klinikailag típusos *Erythema migrans* szerológiai vizsgálattal történő alátámasztása nem szükséges (a betegség tapasztalt klinikus számára nagy biztonsággal felismerhető; az ellenanyag szint korai esetben nem feltétlenül emelkedett). Laboratóriumi megerősítés ajánlott olyan betegeknek, akiknél nem volt lehetőség expozícióra (expozíció = az EM jelentkezését megelőzően nem több mint 30 napon belül kullancsokkal potenciálisan fertőzött területen történő tartózkodás.) A kullancscsípés tényének megállapítása nem feltétel.

Laboratóriumi vizsgálati eljárások

A gyakorlatban, a laboratóriumi diagnózis alapja ma még szerológiai vizsgálat. Az egyéb mikrobiológiai vizsgálatok viszonylag alacsony érzékenységek, a standardizálás hiánya, vagy specializált laboratórium igénye miatt a diagnosztikában kiegészítő vizsgálatként alkalmazhatók. Ilyen, a diagnosztikában kevésbé elterjedt egyéb vizsgálatok a következők:

- tenyésztés: leginkább bőrelváltozásoknál vezethet eredményre, amikor elegendő számú baktérium van jelen;
- PCR: alkalmazása ígéretes synoviális folyadék, esetleg CSF vizsgálatára (*target: OspA, OspC, vlsE*). Az eljárás egyelőre nincs standardizálva, nem alakult ki egységes álláspont a primerek, amplifikációs paraméterek használatáról. A módszer alkalmas lehet epidemiológiai vizsgálatokra (*OspA* szubtipusok meghatározása).

Szerológiai vizsgálatok

A laboratóriumba küldendő teljes vér vagy szérum, neurológiai tünetek esetén a vérrel egy napon levett liquor is (az intrathecalis ellenanyagok kimutatására). A vizsgálat szakmai ajánlások szerint [2, 3, 4], gazdaságossági szempontokat is figyelembe véve, két lépcsőben történik.

- I. Szűrés, megfelelő érzékenységgű teszttel (amely általában megfelelő érzékenységgű ELISA)

Az IgM és IgG ellenanyagok meghatározását külön végezzük (jelenlétükből következtetés vonható le a betegség stádiumára).

Az IgM vizsgálatnak csak az első három-hat hónapban van diagnosztikus értéke. A ké-

sőbbiekben az IgM pozitívitásnak klinikai relevanciája nincs, az IgM ellenanyag klinikailag gyógyult betegnél évekig perzisztálhat. Pozitivitása IgG emelkedés nélkül, 6 hónapnál régebben fennálló panaszok esetén a klinikus számára félrevezető lehet.

Az ELISA vizsgálatban titermeghatározást nem végzünk, mivel a titer jellemzően igen lassan változik (sikeres kezelést követően akár emelkedhet is), a változás sokszor csak évek távlatában értékelhető.

Az ELISA-ban keresztreakciót, illetve fals pozitívítást okozhat számos betegség, például syphilis, EBV, CMV, *Mycoplasma pneumoniae*, HIV, autoimmun betegségek.

A kitek megválasztásánál lényeges szempont a megfelelő antigénösszetétel, emellett fontos a megfelelő cut-off alkalmazása. Laboratóriumunkban jó tapasztalatokat szerezünk rekombináns antigéneket tartalmazó kit alkalmazásával.

Amennyiben a szűrővizsgálat eredménye pozitív vagy határérték:

II. megerősítő vizsgálatot végzünk magas specifitású teszttel (Western blot), teljes test antigének, vagy rekombináns vagy szintetikus antigének kombinációjának alkalmazásával.

A WB nem kvantitatív vizsgálat, érzékenysége nem jobb az ELISA-nál, de specifikusabb annál [5]. Lehetővé teszi az egyes antigénekkal szemben adott válasz jobb differenciálását, a fals pozitívák kiszűrését, és következtetni enged a stádiumra (korai fázisban jellemzően két-három, késői stádiumban egyre több antigén ellen jelennek meg ellenanyagok). Mivel a megerősítő vizsgálat a Lyme szerológiai protokollal szerves része, a minták felesleges utaztatásának elkerülésére és az eredmények késleltetésének megelőzésére a Lyme szerológiai vizsgálatokra vállalkozó laboratóriumnak felkészültnek kell lennie (eszközök és szakemberek vonatkozásában) megerősítő vizsgálatok elvégzésére, és szűrővizsgálatok fenntartására is.

Nincs egyetlen olyan antigén, amelynek reaktivitása megbízhatóan igazolná a betegség fennállását, ezért antigének kombinációját alkalmazzuk. Az ajánlott antigénkombináció egyre bővül, újabb igen specifikus, rekombináns epitópokkal, szintetikus peptidekkel (*DbpA*, *VlsE*). Európában legalább három, genospecies okoz megbetegedéseket (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*), és bár azok alapvetően hasonló antigéneket expresszálnak, az egyes genospeciesek, sőt a törzsek közt jelentős kü-

lönbségek is megfigyelhetők. Ezek a különbségek igen megnehezítik az egyes genospeciesek által okozott fertőzések esetében optimálisan alkalmazható immunserológiai tesztek kifejlesztését. Előnyösen olyan tesztet alkalmazunk, amely a lehető legnagyobb fokú keresztreaktívítást mutat a különböző genospeciesekkel.

Az eredmények értékelése

Számos munkacsoport fáradozik standardizált interpretálási kritériumok kidolgozásán [6, 7]. Egyelőre nem sikerült olyan szabályt kidolgozni, amely elfogadható szenzitivitással és specifitással egységesen alkalmazható lenne speciestől, teszteltől és geográfiai egységektől függetlenül. Úgy tűnik, az alkalmazandó kritériumok Európában és Amerikában eltérnek. Az európai epidemiológiai helyzetnek jobban megfelelő interpretációs szabályok kidolgozását tűzték ki célul multicenter vizsgálatainkban Hauser és mtsai. [8, 9]. A kereskedelmi forgalomban lévő nagyszámú, sokszor nem kellően standardizált teszt alkalmazása miatt az egyes laboratóriumok eredményei nehezen összehasonlíthatóak. A standardizálás talán magas immunogenitású és specifitású, rekombináns antigének alkalmazásától várható.

Általánosságban, a következőket tekinthetjük irányadónak:

I. Amennyiben a szűrővizsgálat negatív (IgM/G): „a beteg vérében *B. burgdorferi sensu lato* elleni specifikus ellenanyagok nem mutathatók ki.

DE!: típusos ECM-nél csak a betegek mintegy felében mutathatók ki ellenanyagok, ez elsősorban klinikai diagnózis (lásd fent). A beteg érdekében nem érdemes a kezeléssel a szerokonverzióig várni.

Ismételt szerológiai vizsgálatra csak azokban az esetekben van szükség, amikor a betegség: a) nem típusos ECM; b) korai fertőzés gyanúja áll fenn, például neurológiai vagy atípusos bőrtünetekkel, és még várható a szerokonverzió.

Ismétlést csak 4-6 hét múlva érdemes kérni (mivel az ellenanyagválasz viszonylag lassan változik (kivételet képeznek a súlyos neurológiai formák, ilyenkor szorosabb monitorozásra van szükség, hogy minél előbb kimutassuk az esetleges pozitívítást).

II. Ha a tesztek egyike pozitív vagy kétes (és a tünet nem típusos ECM) a fent említettek szerint Western-blotot végzünk.

Ha a blot (= megerősítő vizsgálat) eredménye negatív, a végső eredmény negatívnak tekintendő („*B. burgdorferi* elleni specifikus ellenanyagok a beteg vérében nem mutathatók ki”). Ha a blot eredménye pozitív, „a beteg vérében *B. burgdorferi sensu lato* elleni specifikus ellenanyagok mutathatók ki”, az eredmény az adott immunglobulin osztályra nézve pozitív.

Ha a Western blot eredménye kétes, ismétlést kérünk. Amennyiben az ismételt vizsgálat nem mutatja a reaktivitás növekedését, a kimutatott antitestválasz nagy valószínűséggel régebbi fertőzés maradványa.

A végső eredményt akkor tekintjük pozitívnak, ha az ELISA eredményét a Western blot is alátámasztja.

A kellően széles csíkspektrummal szembeni pozitív IgG válasz megfelelő klinikai tünetekkel (és expozíciós anamnézissel) együtt kompatibilis késői stádiumú aktív Lyme-kórral (de utalhat régebbi, latens, vagy megfelelő kezelésre gyógyult kórformára is, tehát csak a fertőzés tényére enged következtetni). Endémiás területen élőknel (vadászoknál, erdészeknél, rendszeres kirándulóknál) klinikai tünetek nélkül is gyakori a szeropozitivitás.

Késői stádiumban a szoliter IgM-pozitivitást nem tekintjük diagnosztikus értékűnek. (Ilyenkor, az IgM pozitivitás IgG emelkedés nélkül nem igazolja késői stádiumú Lyme betegség gyanúját).

Megjegyzések

Klinikailag gyógyult ECM tünetmentesség esetén nem indokolja kontroll vizsgálat elvégzését (félrevezető lehet a klinikai gyógyulás ellenére perzisztáló ellenanyagok jelenléte; fontos szempont a felesleges, ismételt antibiotikum-kezelések elkerülése).

A szerológiai vizsgálat késői esetekben, az ellenanyagok gyakori perzisztálásának következtében csak igen korlátozottan alkalmas a betegség aktivitásának kimutatására, illetve az antibiotikum hatásosságának ellenőrzésére. Amennyiben legalább fél éves intervallummal levett minták állnak rendelkezésünkre, azokat Western blottal párhuzamosan vizsgálhatjuk, és összehasonlíthatjuk – ilyenkor az egyes csíkok halványodására vagy újabb csíkok megjelenésére figyelünk.

Neuroborreliosisnál szérumot és liquort együtt vizsgálunk! A neuroborreliozist akkor tekinthetjük igazoltnak, ha intrathecalisan termelődött ellenanyagokat is találunk. Ennek mintázata eltérhet a szérumétól, és a pozitivitás előbb kimutatható lehet, mint a szérumban. Perifériás neurológiai elváltozások esetén nem mindig mutatható ki eltérés a liquorban.

ACA (késői bőrelváltozás) esetén nagyon erős, jellegzetes IgG pozitivitást találunk.

Késői rheumatológiai esetekben szintén IgG pozitivitást várunk.

Hangsúlyozzuk, hogy az ellenanyag-vizsgálattal baktérium ellen irányuló specifikus immunválaszt mutatunk ki. Azt azonban, hogy az általunk kimutatott immunválasz összefüggésbe hozható-e a beteg panaszával, csak a klinikussal szorosan együttműködve dönthető el (konzultáció jelentősége).

Differenciáldiagnosztikai szempontból nem szabad megfeledkeznünk arról sem, hogy az *Ixodes* kullancsok számos egyéb kórokozó vektorai lehetnek. Olyan betegnél, akinél kullancs által terjesztett betegség igazolt, nagyobb az esélye egyéb kullancs által terjesztett mikroorganizmussal történő koinfekciónak is.

Összefoglalva, tudatában kell lennünk a laboratóriumi vizsgálatok lehetőségeinek és korlátainak ahhoz, hogy megfelelően alkalmazzuk és interpretáljuk őket.

Szükség van továbbá a tesztelésre vonatkozó ajánlások rendszeres frissítésére az időközben rendelkezésre álló új információk alapján.

Dr. Kienle Zsuzsa

Irodalom:

1. *Center of Disease Control and Prevention, Lyme Disease , Morb. Mort. Wkly. Rep. 50, 181 (2000)*
2. *EUCALB („European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis”) (2000, 2003)*

3. NCCLS, M34-A, 20(20) – Western blot analysis for antibodies to *Borrelia burgdorferi*: Approved guideline (2000)
4. Wilske és mtsai.: *MiQ* 12 (2000)],
5. Auwaerter P.G. és munkatársai: *Expert Reviews in Molecular Medicine* 6, 19 (2004)]
6. Engstrom és mtsai.: *J. Clin. Microbiol.* 33, 419 (1995)
7. Dressler és mtsai.: *J. Infect. Dis.* 176, 392 (1993)]
8. Hauser és mtsai.: *J. Clin. Microbiol.* 37, 2241 (1999)
9. Hauser és mtsai.: *J. Clin. Microbiol.* 38, 2097 (2000)

***Mycoplasma pneumoniae* és *Chlamydia pneumoniae* fertőzések szerodiagnosztikája**

A *Mycoplasma pneumoniae* (továbbiakban *M. pneumoniae*) elterjedt humánpatogén baktérium, mely aszimptomatikus, vagy enyhe tünetekkel járó, ritkábban súlyos alsó-, ill. felső légúti kórképeket idézhet elő. A kórokozó másodlagosan egyéb, valószínűleg autoimmun mechanizmuson alapuló extrapulmonaris kórképekért is felelős lehet (meningoencephalitis, pericarditis, haemolyticus anaemia, arthritis, mucocutan laesiók, gastrointestinalis tünetek stb.). A fertőzések zöme gyermek-, fiatal felnőttkorban, ill. immunhiányos betegekben jelentkezik. A kórokozó a fertőzést követően akár hónapokon át is perzisztálhat a szervezetben. A tünetmentes hordozás miatt nehéz megbecsülni az önmagában végzett közvetlen kimutatási technikák (tenyésztés, PCR) szignifikanciáját. Ennek következtében a klinikailag aspecifikus fertőzések rutinszerű laboratóriumi diagnosztikájának alappilléret jelenleg a szerológiai módszerek jelentik. A szerodiagnosztika a *M. pneumoniae* lipid és fehérje antigénjei által kiváltott markáns antitestválaszt detektálja, és a 2-4 hét különbséggel, az akut és a konvalescens fázisban vett szérumbintákban egyidejűleg vizsgált IgA-, IgG-, ill. IgM-szintek változásából igazolni lehet a fertőzés tényét. Mivel a primer fertőzés kapcsán kialakuló immunválasz nem nyújt tartós védettséget, a *M. pneumoniae* fertőzésre jellemző a gyakori reinfekció.

A kutatások szerint a *M. pneumoniae* major immunogen komponense a baktérium megtapadásáért felelős, sejtfelszíni 170 kDa (P1) protein, bár más fehérjék immunogen szerepét is leírták (pl. 90 kDa protein); ugyanakkor hordozók szervezetében a P1 protein-ellenes ellenanyagok gyakran nincsenek jelen. A szűrővizsgálat céljára használatos ELISA módszerhez tehát célszerű megfelelő szenzitivitású és specificitású; tisztított, dúsított P1 protein-antigént alkalmazó kiteszt választani. Laboratóriumunkban a Western blot technika bevezetése óta alkalmunk volt számos kereskedelmi forgalomban lévő ELISA kiteszt összehasonlítani és értékelni, melyek közül kimagaslóan jó eredményeket tapasztaltunk pl. az AniLabsystems, ill. a Virion/Serion által gyártott kitekkel.

Mivel az akut fertőzés markerei közül a specifikus IgM-válasz a 20 évnél fiatalabb korcsoportban is csak a betegek 80%-ában alakul ki; a 20 évnél idősebb populációban pedig a betegek mindössze 40%-ában jellemző, ráadásul az IgM akár egy évig is

perzisztálhat; az IgG mellett elengedhetetlen az IgA szint detektálása, ami különösen reinfekció esetén nyújt diagnosztikus segítséget. A specifikus IgA szint általában 5 héttel a fertőzés után lecseng. Akut fertőzésben a specifikus IgM; ill. IgA megjelenése általában az infekció kezdetétől számított 7-10 napon belül várható; míg a specifikus IgG szintje 9-14 nap múlva indul emelkedésnek és akár 4 évig is perzisztálhat.

Laboratóriumunkban 2003. év folyamán bevezettük a *M. pneumoniae* IgA/IgG/IgM Western blot (Virotech) technikát, mellyel ezidáig közel 2500 vizsgálatot végeztünk. A *M. pneumoniae* szerodiagnosztika „gold standard”-jának számító költséges, de igen érzékeny és specifikus módszerét az általunk kidolgozott diagnosztikus irányelvek szerint fenntartjuk a súlyos fertőzésben szenvedő, hospitalizált betegek számára az alsó légúti fertőzések; ismeretlen eredetű lázas állapotok; ill. krónikus, vagy szövődményes gyermekgyógyászati kórképek (pl. anaemia, arthritis, erythema nodosum stb.) diagnosztikájára. Mivel a Western blot technika az ELISA módszerektől eltérően a kit kihasználtsága érdekében nem teszi szükségessé nagyobb számú minták összegyűjtését, kiválóan alkalmas a sürgős szerodiagnosztikai igény teljesítésére.

A Western blot technika interpretálását nehezíti, hogy nem létezik olyan kizárólagos protein, melynek pozitivitása önmagában specifikus lenne a *M. pneumoniae* fertőzésre. Az értékelés jellegzetessége, hogy a magas (HMW) proteinek, P1, P100, P90, P65, P40, P30, stb.); ill. alacsony specificitású, de a fertőzéssel szoros asszociációt mutató, addicionális markereket (DnaK, P50, P47, P12, LP, GL stb.) képviselő csíkokat kapcsoltan és összegezve kell értékelni. Külön figyelmet kell fordítani a korcsoport szerinti értékelés jellegzetességeire. (0-4 éves korig már 5 specifikus csík megjelenése is alátámasztja a pozitív eredményt.) A módszer lehetővé teszi a P1 antigén-negatív, kevésbé virulens *M. pneumoniae* törzsek elkülönítését is. A savópár ismételt vizsgálatokor természetesen az észlelt mintázat jellegének, összetételének változása jelzi az antitestszint alakulását. Laboratóriumunkban az említett teszttel rendkívül jó tapasztalatokat szerezünk, melyek megbízhatóan tükrözik a klinikai hátteret.

A *Chlamydia pneumoniae* (továbbiakban *C. pneumoniae*) elsősorban a gyermek- és fiatal felnőttkori, zömében enyhe lefolyású pneumoniák gyakori kórokozója. Emellett pharyngitist, sinusitist, otitist, bronchitist, pneumonitist is előidézhet, és különösen idősebb korban súlyosabb megbetegedéseket okozhat. A fertőzést követően reaktiv arthri-

tis is felléphet, ill. tisztázásra vár a kórokozó szerepe az atherosclerosis és a stroke etiológiájában. A gyakori reinfekció mellett tünetmentes hordozás is előfordulhat, ill. ismeretes, hogy a kórokozó a szervezetben belül perzisztálhat. Az előbbiek következtében, ill. az alsó légúti, invazív mintavétel nehézségei miatt a rutinszerű diagnosztika alapját nem a közvetlen kimutatási technikák, hanem a szerológiai módszerek képezik. Jelentőségük különösen a mély szöveti, ill. a krónikus fertőzésekben kiemelkedő.

A kórképek szerodiagnosztikájában szűrőműszerként a *M. pneumoniae*-hez hasonlóan ugyancsak az ELISA vizsgálat terjedt el. Bizonyos chlamydia antigénnel szembeni humorális immunválasz egy adott populáción belül heterogén és variábilis jelleget ölt, ezért a kutatások tanúsága szerint célszerű olyan ELISA tesztek alkalmazni, melyek a fertőzést közvetítő, teljes elemi testet (EB) tartalmazzák antigénként. Az ilyen típusú tesztek érzékenysége ui. némileg magasabb, mint az egyes immunogén peptideket, vagy rekombináns antigéneket alkalmazó kitéké.

A primer fertőzést követően átlagosan 3 héten belül kialakul a specifikus IgM válasz, mely kb. 2-6 hónap alatt cseng le, de kivételesen akár egy évig is fennmaradhat. Egészséges egyéneknél IgM ellenanyagot nem lehet kimutatni, tehát megbízható markere az akut fertőzésnek. Az IgG emelkedés általában csak 6-8 hét múlva jelentkezik, lassabban tűnik el, de az IgG ellenanyagok tartósan, akár élethossziglan is perzisztálhatnak. Az IgA válasz általában hiányzik, vagy csak mérsékelt és gyorsan el is tűnik. Primer fertőzésben tehát az IgM detektálása, ill. savópárok vizsgálatokor négyszeres IgG titeremelés nyújt diagnosztikus segítséget.

Ismétlődő, ill. krónikus infekció esetén megfordul a helyzet; az IgM szint általában alacsony vagy ritkán mérhető, helyette gyors, 1-2 héten belüli IgA és IgG emelkedés tapasztalható. Az IgA viszonylag megbízhatóan tükrözi a reinfekciót, ill. a krónikus fertőzést. Kezelés hatására az IgA szintje a baktérium-eradikációval párhuzamosan gyorsan lecsökken az alapszintre.

Chlamydia fertőzés gyanújakor célszerű a fertőzést követő 10.-20. nap között újabb szérumbintát venni és ebben az antitestszinteket párhuzamosan vizsgálni.

Chlamydia fertőzéseknél különösen fontos hangsúlyozni, hogy a humorális immunválasz igen korai szakaszában egyfajta természetes keresztreakció zajlik a különféle chlamydia speciosekkal szemben. Valamennyi immunoglobulin-alkosztály keresztreakál-

hat a humánpatogén speciosekkel; és ezt a jelenséget egyetlen mégoly specifikus antigént alkalmazó szerológiai teszt sem tudja teljesen kiküszöbölni, legfeljebb minimalizálni. Feltételezések szerint krónikus fertőzésben a baktériumsejt konzervatív, kereszt-reagáló struktúrái elleni ellenanyagok is képződnek, ami esetenként a szűrésre használatos, a speciesspecifikus antigének mellett genusspecifikus antigéneket is alkalmazó ELISA módszerek jelentőségét növeli.

Laboratóriumunkban a szérummintákból párhuzamosan elvégzett *C. pneumoniae* ELISA (Novatec) és *C. trachomatis* ELISA (Novatec) teszteknel a klinikai tünetekkel egybeeső eredményeket tapasztaltuk. Az említett keresztreakció mértéke véleményünk szerint nem nehezítette meg az eredmények interpretációját. Verifikáló módszerrel több, mint 1500 alsó légúti fertőzésben vizsgáltuk tovább a kapott ELISA eredményeket, mely ugyancsak a szűrőmódszer megbízhatóságát támasztotta alá.

Verifikáló módszerként a „gold standard”-ként ajánlott microimmunfluorescens technikát (MIF) alkalmazzuk. A MIF (Focus) tesztje LPS mentes, tisztított *C. pneumoniae* EB antigént tartalmaz, azaz species specifikus antitest-detektálást tesz lehetővé mindhárom immunglobulin-alesztályban. A teszt további előnye, hogy az adott savóhígítás egyetlen bemérésével lehetővé teszi az adott szérumminta reaktivitásának vizsgálatát *C. psittaci* és *C. trachomatis* antigénekkal szemben is. A laboratóriumunkban kidolgozott diagnosztikus irányelvek szerint az akut fertőzésre jellemző véghígításban vizsgáljuk a szérummintákat (ez IgA esetében 1:32; IgG esetében 1:256; ill. IgM esetében 1:10). A MIF technikát az alábbi feltételek esetén alkalmazzuk a mélylégúti fertőzésben szenvedő betegek mintáinál:

- A. Akut fertőzés tüneteivel asszociáltan kétes, ill. alacsony pozitivitású ellenanyag értékeket mutattunk ki
- B. Krónikus fertőzésben titermeghatározásra van szükség a folyamat progressziójának megítéléséhez.
- C. Korábban MIF pozitív minta savópárjának vizsgálatakor
- D. Ornithosis gyanú esetén.
- E. Sürgősséggel feldolgozandó mintáknál is ezt a módszert alkalmazzuk súlyos fertőzésben, ill. neonatalis pneumonia (*C. trachomatis*) gyanújakor.

Valamennyi szerológiai vizsgálat korlátozó tényezője, ha túl korai mintavétel esetén még nincsenek detektálható antitestek; ill. túl késői mintavétel kapcsán a magas titerű antitestszint miatt már nem észlelhető szerokonverzió. Perzisztáló antitestek gyanúja esetén javasolt két hét elteltével beküldött harmadik szérumminta vizsgálata.

Összegzésként hangsúlyoznánk, hogy megfelelő szenzitivitású és specificitású tesztek alkalmazásával a szerodiagnosztika változatlanul fontos helyet tölt be a mikrobiológiai vizsgálatok között. Előnye az egyszerűen megvalósítható mintavétel, a minták tartós tárolási lehetősége, továbbá az, hogy a szerológiai módszerek segítségével gyorsan elkülöníthetőek az akut, a krónikus, ill. a lezajlott fertőzések; sőt a kimutatható antitest-típusok a betegség stádiumának meghatározását is segítik. Valamennyi esetben szem előtt kell tartani, hogy az eredményeket csak a klinikai tünetekkel egybevetve; a beteg korának, immunstátusának; a betegség kezdetének; a korábbi/aktuális antibiotikus terápiának stb. ismeretében szabad értékelni.

Dr. Balla Eszter

Petrovay Fruzsina

Boross Katalin

Irodalom:

1. *Molecular Medical Microbiology 2002, 1703-1716; 1825-1850*
2. *Manual of Clinical Microbiology (8th ed.), 2003, 972-990; 991-1004*
3. *J Clin Microbiol. 1998, Feb; 548-551*
4. *J Clin Microbiol. 1998, Nov; 3155-3159*
5. *J Clin Microbiol. 1999, Jan; 14-17*
6. *Reviews in Medical Microbiology 1991, 2:83-90*

A Bordetella pertussis által okozott légúti fertőzés diagnosztikája

Az utóbbi években emelkedett a pertussis-szindrómás betegek és a laboratórium által igazolt *B. pertussis* pozitív esetek száma, nemcsak az oltatlan csecsemők, hanem a serdülők és a felnőttek körében is. Ennek oka lehet a virulencia gének kifejeződésének /expressziójának/ illetve virulencia faktorainak, antigénjeinek változása /evolúciója/.

Egyre több megfigyelés igazolja, hogy a csecsemők és gyermekek pertussisa a felnőttek „enyhébb”, atípusos megbetegedéseiből származik. A felnőttek gyakran tünetmentes hordozók, ill. nyugat-európai vizsgálatok szerint az elhúzódó, súlyos köhögéssel járó kórformák háttérében több mint 10%-ban bordetellák okozta megbetegedés áll.

Komplikációk, szövődmények főleg csecsemőknél és a gyermekeknél léphetnek fel, pl. pneumonia, otitis media, encephalopathia formájában. Pertussishoz hasonló tüneteket okozhatnak még chlamydiák vagy mycoplasmák, adenovírusok valamint *Haemophilus influenzae* és *Moraxella catarrhalis* is. Gyakori a kevert fertőzés, ezért a kórokozók elkülönítésében nagy jelentőséggel bír a tenyésztés.

A. B. pertussis okozta fertőzés igazolására szolgáló módszerek:

1. Direkt módszerek:

- Tenyésztés
- DIF
- PCR
-

2. Indirekt módszerek:

- ELISA
- IF
- WesternBlot

Megfelelő időben és megfelelő módon a nasopharynxból történő mintavételt követően laboratóriumunkban lehetőség van a speciális táptalajt /Bordet-Gengou/ igénylő tenyésztésre, valamint légúti mintából direkt antigén kimutatásra /DIF/ is. A DIF vizsgálat előnye a 3-5 napig tartó tenyésztéssel szemben, hogy 2-3 órán belül eredmény adha-

tó ki, valamint az antibiotikum terápia miatt elhalt kórokozók is kimutathatók, de ügyelnünk kell arra, hogy keresztreakciót adhat *B. parapertussis*-al, *H. influenzae*-vel /és egyes szerzők szerint a normál flórával is/.

A direkt módszerek összehasonlítását a következő táblázat mutatja:

	Specificitás %	Szenzitivitás %
Tenyésztés*	85-100	73
DIF**	33	66
PCR*	98	95-98,9

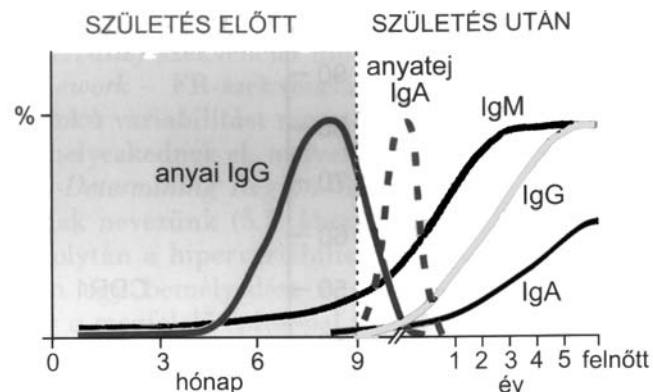
*Wadowsky, RM, et al. J.Clin Microbiol 1996; 34:2645

**Halperin, SA, et al. J.Clin Microbiol 1989; 27:759

A *B. pertussis* érzékenysége, nehéz tenyésztetősége és identifikálhatósága miatt kiemelten fontos a szerológiai módszerek alkalmazása a rutin diagnosztikában. Ezekkel a módszerekkel lehetőség van a vakcináció után termelődött ellenanyagok /IgG, IgM/ elkülönítésére az akut fertőzésre utaló IgA ellenanyagoktól.

Primer fertőzéskor először IgM típusú antitestek jelennek meg: az első fertőzés után 5-10 nappal és 6-12 hétig perzisztálhatnak. Az IgA antitestek a fertőzést követő 11. nap után jelennek meg a szérumban és 6-24 hónapig is perzisztálhatnak. Az IgG antitestek a betegség kezdete után 2-3 héttel jelennek meg és évekig perzisztálhatnak. IgG típusú antitestek vakcinációt követően is hosszú időn át kimutathatóak. Az oltás – ellentétben a természetes fertőződéssel – nem ad életre szóló védeltséget.

Az oltatlan csecsemők esetében a betegség laboratóriumi diagnosztizálásakor problémát okozhatnak a maternális ellenanyagok /pl. a placentán átjutó IgG antitestek/ és az anyatejjel átjutó IgA típusú ellenanyagok elkülönítése a csecsemők saját ellenanyagaitól. Indokolt tehát anyai vérminta egyidejű beküldése is. Egyes szerzők szerint a csecsemőknek 6 hónapos kor alatt, mások szerint 1 éves kor alatt nincs saját IgA típusú ellenanyag termelése. Tehát a csecsemők esetében elsősorban az IgM ellenanyag szint meghatározása a diagnosztikus értékű.



A pertussis infekció diagnosztikájában kiemelt szerep tulajdonítható a Pertussis Toxinak, – melyet egyedül a *B. pertussis* termel, bár génje a *B. parapertussis*-ban is jelen van –, valamint az adhezinek csoportjába tartozó FHA protein kimutatásának, bár ez az előbbinél kevésbé specifikusnak tekinthető.

Laboratóriumunkban kipróbálás alatt áll az eddig használt ELISA tesztnél szintén specifikusabb és szenzitívebb IF teszt, amely az IgM típusú ellenanyagot is kimutatja, és lehetőséget nyújt *B. parapertussis* irányában történő vizsgálatokra is. Fontosnak tartottuk az eddig alkalmazott szűrő- /ELISA/ vizsgálat mellett különböző verifikáló módszerek bevezetését, az immunfluoreszcenciás /IF/ és a WesternBlot alapú immunoblot vizsgálatokat. Az eddig használt ELISA kit helyett egy specifikusabb, Bordetella pertussis Toxin ELISA tesztre térünk át /Virotech/. Ezzel a szűrővizsgálattal pozitívnak ill. kétesnek bizonyult minták eredményeinek megerősítésére a Virotech cég *B. pertussis* Eco-Line /Immunoblot/ kitjét használjuk, mely érzékenyebb és specifikusabb az ELISA vizsgálatoknál. Ez a módszer a Pertussis Toxin és az FHA /Filamentózus Hemagglutinin/ proteinre specifikus antitestek kimutatásán alapszik, hátránya azonban, hogy az IgM ellenanyag kimutatására nem alkalmas.

2003-ban a vizsgált minták módszerek szerinti megoszlását pozitivitás alapján a következő táblázat tartalmazza:

Év	ELISA						WesternBlot			
	IgA		IgG		IgM		IgA		IgG	
	Összes minta	Pozitív minta	Összes minta	Pozitív minta	Összes minta	Pozitív minta	Összes minta	Pozitív minta	Összes minta	Pozitív minta
2003	76	24(31%)	76	36(47%)	76	34(44%)	46	6(13%)	46	25(54%)

Terveink között szerepel a kitenyészett izolátumok antibiotikum-érzékenységének vizsgálata és a PCR módszer kipróbálása, bevezetése.

Kalácska Judit
Varga Aranka
Bognár Csaba

Irodalom:

1. Heininger U.: *Eur. J. Pediatr.* 2001,160, 203-213
2. De Melker, H.E. et al.: *J.Clin. Microbiol.* 2000, 38(2), 800-806
3. Halperin, SA. et al. *J.Clin Microbiol* 1989; 27:759
4. Müller FM, Hoppe JE, Wirsing von König CH.: *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35: 2435-2443
- 5./ Swidinski, S. *Diagnostische Bibliothek*, 1997, 47.
6. Wadowsky, RM, et al. *J.Clin Microbiol* 1996; 34:2645

Néhány újabb szempont az ESBL termelés vizsgálatához

A legelterjedtebb széles spektrumú β -laktamázokat (ESBL) meglehetősen jól definiálhatjuk: Ambler szerint A vagy D molekuláris osztályba (a Bush féle funkcionális osztályozás alapján 2be és 2d csoportba) tartoznak, képesek hidrolizálni az oxyimino cephalosporinokat (ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon) és működésüket a β -laktamáz inhibitorok (klavulánsav, tazobactam, sulbactam) általában gátolják. Mindemellett monobactamokkal szemben is rezisztenciát biztosítanak. Jelenleg az ESBL géntípusok száma 200 felé közelít. Az *Enterobacteriaceae* család tagjai leginkább a SHV- és TEM-típusú ESBL-ekkel rendelkeznek, de egyre több európai országban terjed a CTX-M típus is.

A különböző ESBL termelő törzsek in vitro rezisztenciaképe igen változatos. Ennek egyik oka, hogy ezek a β -laktamázok gyakran más β -laktamázokkal, vagy egyéb rezisztencia mechanizmussal együtt jelennek meg. Talán még nagyobb probléma, hogy sokszor a harmadik generációs cephalosporinokkal szemben in vitro érzékenyek vagy mérsékeltnek mutatkoznak. Ezekben az esetekben rutin antibiotikum vizsgálattal nem tűnik fel a gének hordozása.

Számos klinikai vizsgálat bizonyította, hogy az ESBL termelő patogének okozta nosocomiális fertőzések mortalitása sokkal nagyobb, ha nem ismerik fel a hordozást, és emiatt cephalosporinnal kezelik a beteget. Az időben felismert rezisztenciamechanizmus azonban a betegek hatékony kezelésére, és a járványügyi szakembereknek a megfelelő intézkedések meghozatalára ad lehetőséget.

A 2. évf/2. számú körlevélben már írtunk az ESBL termelés fenotípusos vizsgálatáról. Most további tapasztalatainkról és észrevételeinkről ejtünk néhány szót.

Inokulum hatás: Az NCCLS ajánlása szerint a mikrodilúciós módszereknél 10^5 CFU/ml sűrűségű baktérium szuszpenziót kell alkalmazni. Az irodalom alapján ekkor a bizonyítottan ESBL-t termelő törzsek jelentős része (30-80%) a harmadik generációs cephalosporinokra in vitro érzékeny. A csíraszámot 10^7 CFU/ml-re emelve ez a szám 0-5 %-ra csökken. Ebben az esetben a cefepim (FEP) rezisztens törzsek aránya megnő, de pl. cefotetannál (CTT) és meropenemnél (MEM) nincs jelentős változás. Több esettanulmányban is leírták, hogy a patogének csíraszámja eléri ezt az értéket: pl. endocarditisnél szövetben 10^9 - 10^{10} CFU/g-t, míg meningitisben 10^9 CFU/ml-t kórokozót mutattak ki.

Ajánljuk, hogy az ESBL termelés gyanújának felmerülésekor 0,5 McFarland baktérium szuszpenzióból 100 μ l-t, szokásosan ez 10 μ l, kenjünk ki a Mueller-Hinton táptalajra, és így végezzük el a β -laktám antibiotikumok rezisztencia vizsgálatát.

***Klebsiella spp.* és *Escherichia coli*:** Talán ez a két csoport az, melynél a legkevesebb problémát okoz az ESBL termelés felismerése. Szeretnék azonban egy-két gondolatot felvetni, amire a rutinban és az ESBL termelés vizsgálatokor érdemes odafigyelni.

1. A rutin korongdiffúziós rezisztencia meghatározásnál érdemes a korongokat úgy elhelyezni, hogy amoxicillin/clavulánsav (AMC) szomszédságába tegyük a ceftazidimet (CAZ) és a cefotaximot (CTX), vagy az AMC korongot helyezzük a lemez közepére.

2. Kétkorong diffúziós teszt: ESBL termelés **szűrésekor** a legjobban alkalmazható β -laktám a cefpodoxim (CPD), mivel gátlási zónája alapján az ESBL termelők és nem termelők egyértelműen elkülöníthetők. A CAZ és a CTX korongok vizsgálata is szükséges, mert – vizsgálataink alapján – a Magyarországon elterjedt SHV-5 típus a CAZ-t, míg a második leggyakoribb SHV-2a típus (és az eddig egy alkalommal már leírt CTX-M típus) a CTX-et hidrolizálja jobban, sőt CAZ-ra akár érzékeny eredményt is adhat. Az ESBL termelés felismerése miatt fontos a 3. generációs cefalosporinok vizsgálata minden Gram-negatív izolátum esetében.

3. A 3. évf/2. számú körlevélben már volt szó a *K. oxytoca* OXY-1 és OXY-2 **β -laktamázáról**. Túltermelésük AMC-ra, ceftriaxonra (CRO) és aztreonámra (ATM) rezisztenssé teszik a törzset, de érzékeny marad CAZ-ra és CTX-re. Sajnos az ESBL E-test ebben az esetben hibás pozitív eredményt adhat, de a módosított szinergizmus teszt (5-korongos teszt) képes megmutatni a különbséget. Ezeket a törzseket cefuroximra, ceftriaxonra és aztreonámra rezisztensnek kell kiadni, míg ceftazidimre, cefotaximra és cefepimre – az in vitro eredmény függvényében – érzékeny is lehet.

4. Automata rendszerek (VITEK, BD Phoenix) és az ESBL kimutatásának lehetősége: Különböző *Klebsiella spp.* és *E. coli* törzsek rezisztencia mechanizmusának interpretálását hasonlították össze Leverstein-van Hall és munkatársai. Úgy találták, hogy a Phoenix rendszer (szenzitivitás: 92%, specificitás 82%) jobb, mint a VITEK1 ill. 2 rendszeré (szenzitivitás: 83% ill. 74%, 82% ill. 85%). Kiemelik emellett, hogy ezeknél a törzseknél az ESBL E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden), mely elfogadott confirmáló

teszt, szenzitivitása 100%, és specificitása 87%, de ezt az érzékenységet E-tesztel is csak abban az esetben lehet elérni, ha mind a CAZ+CAZ/CLA mind a CTX+CTX/CLA tartalmú csíkot használják, a teszthez mellékelt használati utasítás szerint.

5. Porinok: A Gram-negatív baktériumoknál a külső membrán felépítése (lipopoliszaharid, foszfolipid kettősréteg, a külső membrán fehérjék (OMP)) jelentősen befolyásolja a permeabilitást. A β -laktám vegyületek hatékonysága függ attól, mennyire képesek bejutni a periplazmatikus térbe. A *Klebsiella pneumoniae* Omp35, Omp36 (*E. coli* OmpC és OmpF) és Omp37 porinjai felelősek ezért. Ezek hiánya vagy deficienciája multirezisztens fenotípust adhat, melybe az inhibitoros kombinációk, (β -laktám/ β -laktamázgátló) is beletartoznak. Önmagukban ezek a változások csak kisebb MIC emelkedést okoznak, de ESBL termelőknél ezeknek a porinoknak a hiánya jelentősen megnöveli a rezisztenciát.

Kromoszómáisan kódolt, indukálható AmpC: A ESBL termelés fenotípusos vizsgálatának fő problémáját az ezt a génkomplexet hordozó törzsek adják (pl. *Enterobacter sp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia sp.*). A vad típusú AmpC-vel rendelkező és ESBL-t termelő törzseket nem mindig egyszerű elválasztani a derepresszált mutánsoktól, melyek magas szinten termelik az adott fajra jellemző AmpC-típusú β -laktamázt. Milyen lehetőségeink lehetnek ezek elkülönítésére:

- **A kétkorong diffúziós és ESBL E-test** bizonyos esetekben jól működik, de sokszor nem különíthető el velük egyik típus a másiktól. (Köszönhető ez talán annak is, hogy a clavulansav igen jó induktor.)
- **Piperacillin/Tazobactam (TZP):** Bár korábbi vizsgálatok alapján ez a kombináció jól elkülönítette a kétféle mechanizmust (ESBL termelők érzékenyek, AmpC derepresszált rezisztens), de a legújabb eredmények azt mutatják, hogy az ESBL termelők körében is megnőtt a TZP rezisztensek száma (30-50%).
- **Cefotetan:** Jelenleg a legígéretesebb a cefotetan érzékenység vizsgálata. Itt az ESBL termelő törzsek 95%-a, míg az AmpC termelőknél csak 20%-a érzékeny.
- **Cefepim:** Mivel az AmpC-típusú β -laktamázok alig hatnak a cefepimre, ezért ennek vizsgálata ajánlott, mint azt már mi is leírtuk a módosított szinergizmus teszténél (2. évf/2. számú Mikrobiológiai Körlevél).

Azok a törzsek, melyek egyszerre AmpC derepresszált mutánsok és ESBL termelők, a legnehezebben értékelhető esetek közé tartoznak. Ezek kialakulására számítanunk kell, hiszen a főleg konjugatív plazmidon kódolt ESBL gének a kórházi endemikus patogén mikrobák között igen gyorsan terjedhetnek. Bár klinikai szempontból a derepresszált mutánsokat ugyanúgy cefalosporin rezisztenseknek kell tekinteni, mint az ESBL termelőket, de utóbbiak felismerése epidemiológiai szempontból nagyon fontos.

Ilyen törzsekkel kevés tapasztalatunk van, és az irodalomban sem találunk megfelelő adatokat. Fenotípusosan idáig csak cefepim segítségével tudtuk ezeket a törzseket elkülöníteni.

A 2002-2003-as évben beérkezett ESBL termelésre gyanús törzsek vizsgálatával eddig is sok hasznos tapasztalatot szereztünk, melyet igyekszünk a lehető legtöbb fórumon bemutatni. A további sikeres együttműködés reményében, kérjük, hogy továbbra is küldjék be az ESBL termelésre gyanús törzseiket.

Tóth Ákos

Irodalom:

1. Bradford P.A. 2001. *Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clinical Microbiology Reviews. 14:933-951.*
2. Chanawong, A. et al. 2002. *Three Cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. Antimicrob. Agents Chemother. 46:630-637.*
3. Gheorghiu, R. 1997. *Bases of variation in resistance to β -lactams in Klebsiella oxytoca isolates hyperproducing K1 β -lactamase. J. of Antimicrob. Chemother. 40:533-541.*
4. Gruteke, P. et al. 2003. *Patterns of Resistance Associated with Integrons, the Extended-Spectrum β -Lactamase SHV-5 Gene, and a Multidrug Efflux Pump of Klebsiella pneumoniae Causing a Nosocomial Outbreak. J. of Clinical Microbiol. 41:1161-1166.*
5. Hernandez-Alles, S. et al. 1999. *Porin expression in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae. Microbiology. 145:673-679.*

6. Leverstein-van Hall, M. A. et al. 2002. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated Instruments for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J. of Clinical Microbiol.* 40:3703-3711.
7. Martinez-Martinez, L. et al. 1999. Roles of β -Lactamases and Porins in Activities of Carbapenems and Cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1669-1673.
8. Nelson, E. C. et al. 1999. Molecular Basis of AmpC Hyperproduction in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:957-959.
9. Oliver, A. et al. 1999. Ampicillin-Sulbactam and Amoxicillin-Clavulanate Susceptibility Testing of *Escherichia coli* Isolates with Different β -Lactamase Resistance Phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:862-867.
10. Stürenburg, E., Mack, D. 2003. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J. of Inf.* 47:273-295.
11. Thomson, K. S. et al. 1999. Use of Microdilution Panels with and without β -Lactamase Inhibitors as a Phenotypic Test for β -Lactamase Production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1393-1400.
12. Thomson, K. S. et al. 2001. Cefepime, Piperacillin-Tazobactam, and the Inoculum Effect in Tests Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3548-3554.
13. Tzelepi, E. et al. 2000. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. of Clinical Microbiol.* 38:542-546.

Az invazív A csoportú *Streptococcus* (GAS) (*Streptococcus pyogenes*) molekuláris tipizálásának bevezetése, mint a hazai surveillance kialakításának első lépése.

A *Streptococcus pyogenes* által okozott régóta jó ismert kórformák mellett, az 1980-as évek végén egyre gyakrabban kerültek világszerte leírásra, a kórokozó által kiváltott súlyos invazív infekciók, mint a toxikus shock syndroma, necrotizáló fasciitis, septicaemia. Ezek az infekciók kialakulhatnak jelentéktelen traumát követően, amikor a kórokozó a sérülésen keresztül jut a bőr alatti szövetekbe, vagy esetenként a hüvely nyálkahártyáján át a környező szövetekbe. Az invazív, toxikus szöveti nekrozissal járó folyamat általában fulmináns lefolyású, rövid idő alatt szervi elégtelenséghez, disszeminált intravasculáris coagulopathiahoz (DIC), shock-hoz vezet.

Az A csoportú *Streptococcus* számos virulencia faktora vesz részt ezekben a folyamatokban. Ezek a virulencia faktorok: extracelluláris pyrogén exotoxin A,B,C, az újonnan felfedezett exotoxin F (mitogen faktor) és a *streptococcus* superantigének (SSA) pl. SpeG, SpeH, SpeJ, SmeZ.

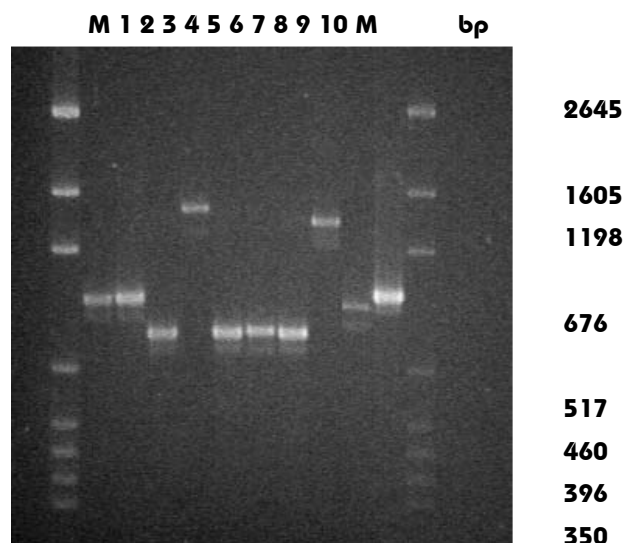
A közölt klinikai esetek és az epidemiológiai tanulmányok azt mutatják, hogy bizonyos M protein szerotípusok M1, 3, 11, 12, és 28 gyakrabban fordulnak elő ezekben a súlyos toxikus kórképekben, s ezek közül is leggyakrabban az M1 és M3 szerotípus. Az M protein egy jelentős felszíni protein és egyben virulencia faktor is. Az M protein alapú szerotipizálásnak a törzs patogenitásában betöltött szerepének vizsgálatán kívül, a nosocomiólisan előforduló invazív *Streptococcus pyogenes* infekciók forrásának felderítésében is jelentősége van.

Bár Intézetünkben a *Streptococcus pyogenes* szerotipizálásának hagyománya van, a klasszikus M protein ellenanyagokkal végzett tipizálás felélesztése ma már túl nagy erőfeszítést kívánna, s kevesebb eredményt adna, mint a világszerte elterjedt és elfogadott molekuláris tipizálás. Intézetünkben jelenleg is folyik a T protein antigén alapú tipizálás, amelynek járványügyi szempontból ugyancsak jelentősége van és ismert, hogy bizonyos T típusok összefüggésbe hozhatók meghatározott M típusokkal. Ennek ellenére a molekuláris M tipizálás bevezetése elengedhetetlen, ha nem akarunk fehér foltként megmaradni az ezzel a témával foglalkozó európai térképen.

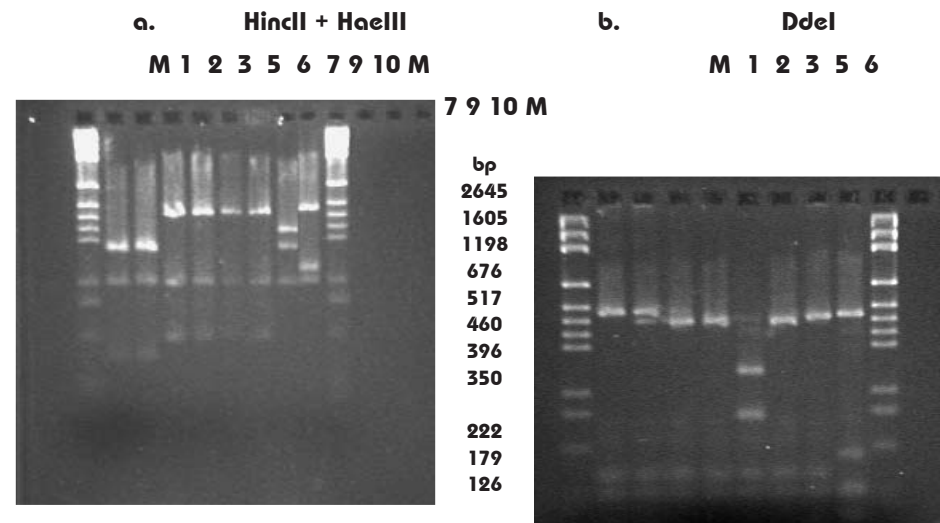
A klinikai bakteriológiai diagnosztikai és a molekuláris epidemiológiai tevékenység során a legjelentősebb a kórokozó virulencia génjeinek kimutatása és jellemzése (tipizálása). A Nemzetközi szakirodalomból jól ismertek azok a korszerű módszerek, melyek alkalmasak az izolátumok genetikai jellemzésére. (1, 2)

Fágtipizálási és molekuláris epidemiológiai osztályon elsőként az M protein termeléséért felelős gén (*emm*) kimutatására és jellemzésére kidolgozott módszert vezettük be. Az *emm* kimutatása PCR alapú (1. ábra), jellemzése PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) technikával (2. a. és 2. b. ábra) valósult meg. A termékek dektálása agaróz gél elektroforézist követően, ethidium-bromiddal végzett festés után, UV megvilágításban történt. (3)

1. ábra
***S. pyogenes* törzsek *emm* gén kimutatása PCR-el**



2. ábra
***S. pyogenes* törzsek PCR-RFLP képe**



A törzsek molekuláris tipizálására PFGE (pulzálatott mezejű gél elektroforézis) és ERIC-PCR módszerek is rendelkezésre állnak.

Célunk a már adaptált módszerek továbbfejlesztése (további törzsekkel is), a gén pontos meghatározása (szekvenálással), az invazív törzsek *emm* génjének jellemzése, adatbázis kialakítása (kapcsolódás nemzetközi adatbázishoz), az epidemiológiai munka támogatása.

Mindezekén túl fontosnak és szükségesnek tartjuk a virulenciában szerepet játszó további faktorok, toxinok molekuláris vizsgálatát is.

Kérjük a laboratóriumokat, hogy az invazív, vagy bármilyen súlyosabb infekciót okozó törzseket küldjék be, a minden laboratóriumnak eljuttatott kísérőlapokkal együtt, hogy megindulhasson és eredménnyel működhessen a nemzeti surveillance, megismerve az invazív *S. pyogenes* előfordulásának gyakoriságát, s az izolált törzsek sajátosságait.

Irodalom:

1. Madeleine W. Cunningham: *Pathogenesis of group A Streptococcal infections. Clin. Microb. Rev. Vol. 13, 470-511. 2000.*
2. *Klinikai és járványügyi bakteriológia, Főszerk.: Czirók Éva, Bp. 1999*
3. CDC: www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep

Tájékoztatást adta:

Krucsó Barbara

Pásztai Judit

Dr. Gacs Mária

„Johan Béla” Országos Epidemiológiai Központ

Fágtipizálási és molekuláris epidemiológiai és Bakteriológia I osztály