



Tartalom:

Minőségellenőrző eljárások szerológiai vizsgálatok esetén
Visontai Ildikó, Bodonyi Anna, Molnár Annamária

Jártassági körvizsgálat 2005.
Bodonyi Anna, Visontai Ildikó, Molnár Annamária

Minimális gátló koncentráció meghatározása Etest-tel
Gacs Mária, Tirczka Tamás

Új terápiás lehetőségek az MRSA-val vívott harcban
Láthatáron egy új szélesspektrumú béta- laktám antibiotikum
Tóth Ákos, Gacs Mária

Minőségellenőrző eljárások szerológiai vizsgálatok esetén

Visontai Ildikó, Bodonyi Anna, Molnár Annamária

Országos Epidemiológiai Központ; Minőségbiztosítási osztály

Egy rutin diagnosztikai laboratórium munkájának túlnyomó részét a szerológiai vizsgálatok képezik. Ahhoz, hogy a vizsgálat validitását biztosítani tudjuk, alapvetően nélkülözhetetlen a szerológia minden területén a megfelelő minőségi kontroll-protokollok biztosítása.

Minőségellenőrzés, kontroll

- A kontroll szorosabb értelemben azt a lépést jelenti, amikor megfelelő kontrollokat alkalmazunk ahhoz, hogy a teszt megfelelő működését igazolni tudjuk. A fogalmat sokszor szélesebb értelmezésben a minőségbiztosítás és a minőségvizsgálat értelmezésben is alkalmazzák.

A szerológiai vizsgálatoknál az alábbi megfontolások alkalmazhatóak:

- A kereskedelmi kitek általában jó minőségűek. Nagyon lényeges, hogy a gyártó által megadott kontrollokat alkalmazzuk minden egyes beállításnál és az értékelés is a gyártó utasítása szerint történjen. Lényeges továbbá, hogy amennyiben olyan ELISA csíkokat használunk, ami több kitből származik, akkor azoknak azonos gyártási száma legyen vagy amennyiben nem, akkor a gyártási számnak megfelelő kontrollokat iktassunk be.

Minőségbiztosítás

- A minőségbiztosítás ugyanakkor egy olyan programot fed, mely biztosítja azt, hogy a végső eredmény, melyet a laboratórium szolgáltat, az helyes.
- A minőségbiztosítás egy olyan zajló folyamatnak tekinthető, mely a teljes laboratóriumi személyzet folyamatos figyelmét követeli meg.

Sok olyan változó van, amely hatással lehet az eredmény minőségére, melyek monitorozása nélkülözhetetlen a minőségbiztosítási program keretében.

- A minta állapota – hemolizáló, lipémiás minta.
- A minta osztása maximális figyelmet követel, hogy a megfelelő minta kerüljön a megfelelően jelölt csőbe.
- A laboratóriumi személyzet oktatása, képzése. Folyamatos képzési programot kell beiktatni, megfelelő egyéni értékeléssel, azon területek meghatározásával, ahol fejlődést lehet elérni.
- Megfelelő belső és külső kontrollok alkalmazása.
- Az eredmények értékelése – a gyártó által megadott kritériumok szerint. Azokban az esetekben, ahol az eredmény szubjektív, ajánlott másik személy általi értékelés.
- Az eredmények beírása. Minden olyan esetben, ahol az eredmények nem automatikusan kerülnek az eredményközlőre, hanem kézi átírással, nagyon nagy a tévesztés lehetősége. Ez a típusú hiba jelentős részét képezheti a laboratóriumban előforduló hibáknak. A hiba elkerülésére egy másik asszisztens által végzett ellenőrzés és az eredményt kiadó által végzett, az eredménykiadás előtti, ismételt ellenőrzés megoldás lehet.
- Az eredménykiadás ideje – az eredmény időben történő közlése.

Minőségellenőrzés:

A minőségellenőrzés a minta teljes útvonalára vonatkozó folyamatellenőrzést jelent a minta átvételétől az eredmény kiadásáig.

A vizsgálat folyamatának ellenőrzése

A minőségi kontroll alatt azokat a lépéseket értjük, amit minden egyes vizsgálatnál be kell iktatni, ahhoz, hogy a teszt megfelelő működését igazolni tudjuk.

Ezek a következők:

1. Minden vizsgálatnál alkalmazni kell az összes kontrollt.
A kitekhez mellékelt kontrollok (negatív, pozitív) a teszt belső kontrollját jelentik. Az ún. belső kontrollok (a teszt tartozéka) nélkülözhetetlen a minőségi kontrollhoz, ezek lot specifikusak. Ezen túlmenően külső kontrollok beiktatásával a teszt folyamatosan megfelelő teljesítményének ellenőrzésére is van lehetőség, a lot-ok közötti különbség felderítésére. A határértéket adó minták az adott vizsgálat teljesítményének jó indikátorai.
2. A kontrolloknak meg kell felelnie a gyártó által megadott azon értékeknek, mely alapján a teszt adott beállítása validálható és elfogadható.
3. Ahhoz, hogy validált eredményeket biztosítsunk, a kiteket lejáratí időn belül szabad csak használni.
4. A megfelelő fizikai paramétereket, mint inkubációs idő, hőmérséklet, követni kell, ahhoz, hogy biztosítani lehessen ezen paraméterek megfelelőségét.

A minőség ellenőrzése körvizsgálattal

A minőség ellenőrzése (proficiency teszt) alatt azt értjük, hogy a laboratórium ennek segítségével meghatározza az általa szolgáltatott eredmény minőségét.

Ez általában egy külső értékelés, melynél a laboratórium rutin munkája mellett beiktatja ismert, már meghatározott minták vizsgálatát (körvizsgálat), s az így kapott eredménnyel a laboratórium teljesítményét értékelik és ez lehetőséget ad az eredmények, eltérések megbeszélésére, a problémák feltárására.

A külső körvizsgálatot ma a minőségbiztosítás elengedhetetlen elemének tekintik és az egyetlen módja annak, hogy a laboratórium vezetője független információt kapjon arról, hogy az ő saját, rutin minőségellenőrzése a gyakorlatban megfelelő és hatékony amennyiben a laboratórium törekszik arra, hogy ezt minél inkább rutin anyagként kezelje.

A minőség-ellenőrzés további lehetőségei:

- Laboratóriumok közötti összehasonlítás
- Módszerek közötti összehasonlítás
- Konzultáció referencia laboratóriummal
- Belső minőség-ellenőrzés vizsgálati rendszer bevezetése. Ez rendszerint magába foglalja a belső kontroll minták (BMK) használatát.

Belső minőségi kontroll (BMK)

- A belső minőségi kontroll (BMK) alkalmazhatjuk az eredmények validálására.

- A kapott eredményeket alkalmazhatjuk a reagensek és berendezések ellenőrzésére is.
- BMK minták nemzetközi, nemzeti vagy saját laboratóriumi mintákból nyerhetőek. (legalább 1 évre elegendő, poolozott minták, megfelelő körülmények között tárolva).
- Az elfogadható értékeket 20 különböző beállítás átlagából és a SD meghatározásával nyerjük.

Esetismertetés

Minőségbiztosítás a körvizsgálatok szervezése során

A minőségbiztosítási körvizsgálatok szervezése során 2005. májusában az első közös EBV és CMV vizsgálat keretében az Országos Epidemiológiai Központ Minőségbiztosítási osztálya összesen 8 EBV-CMV poolozott savómintát állított a vizsgálatokat kérő laboratóriumok rendelkezésére (összesen 8). A minták között 4 poolozott CMV minta szerepelt. A körvizsgálatban résztvevő laboratóriumokban kapott eredményeket a lenti táblázat foglalja össze.

CMV-ellenanyag meghatározások eredményei az egyik laboratóriumban 2 minta esetében eltértek a többi laboratóriumban kapott eredményektől: a 7-es számú minta (CMV-IgG meghatározás) és az 5-ös számú minta (CMV-IgM meghatározás) eredmények különböztek. Ebben a laboratóriumban az alkalmazott teszt egy CMV glikoprotein B (gB)-specifikus ellenanyagon alapuló ELISA kit, amely rekombináns technikával készült: két ismert laboratóriumi CMV törzs (Towne és AD169) gB kisebb fragmentjeit (fúziós antigének), immundomináns doménjét tartalmazza (AD2), amely a gB-specifikus ellenanyagok fokozott detektálhatóságát biztosítja. A referencia módszerek eredményei az AD169 laboratóriumi törzssel végzett vizsgálatokon alapultak, így kiegészítő vizsgálatokra volt szükség.

Kiegészítő vizsgálatok:

7-es számú savóminta

A./ CMV Western blot vizsgálat: CMV (AD169 CMV törzs) IgG; eredmény: negatív

B./ CMV mikroneutralizációs vizsgálat a Towne törzssel szemben (Dr. Gönczöl Éva laboratóriumában); eredmény: negatív, azaz a 7-es számú minta neutralizációs titere <1: 4.

Tehát a kiegészítő vizsgálatok a 7-es számú minta negativitását igazolták a Towne törzssel szemben is.

5-ös számú savóminta

A./ CMV Western blot vizsgálat: CMV (AD169 CMV törzs) IgM; eredmény: negatív

B./ Vírusneutralizációt nem végeztünk tekintettel arra, hogy az nem alkalmas vizsgálati rendszer a kérdés eldöntéséhez. Az 5-ös számú savóminta ugyanis csak az IgM negativitás vizsgálatára szolgált, függetlenül az IgG ellenanyag jelenlététől.

Tehát a Western blot vizsgálat az 5-ös számú minta IgM negativitását igazolta.

Összefoglalva: Az elvégzett kiegészítő vizsgálatok azt igazolták, hogy ebben a laboratóriumban alkalmazott ELISA teszt érzékenysége meghaladja a többi laboratóriumban használt ELISA-k és a kiegészítő vizsgálatok (Western blot, mikroneutralizációs módszer) érzékenységét. A laboratóriumban mért alacsony ellenanyag szintnek azonban valószínűleg nincsen biológiai jelentősége (mikroneutralizációs teszt eredménye negatív). Lehetséges azonban az is, hogy a laboratóriumban alkalmazott ELISA nem-specifikus eredményeket adott.

A fenti eset azt mutatja, hogy érdemes a kérdéses minták eredményeit megerősíteni referencia laboratóriumban, vagy verifikálásra alkalmas tesztet használni, különösen azokban az esetekben, ahol az ellenanyag státusz meghatározása kiemelt jelentőségű.

CMV eredmények összesítő táblázata:

	CMV IgM	CMV IgM	CMV IgG	CMV IgG
Labor	5. minta	6. minta	7. minta	8. minta
1.	negatív	pozitív	<i>határérték</i>	pozitív
2.	<i>pozitív</i>	pozitív	<i>pozitív</i>	pozitív
3.	negatív	pozitív	negatív	pozitív
4.	negatív	pozitív	negatív	pozitív
5.	*	*	*	*
6.	negatív	pozitív	negatív	pozitív
7.	negatív	pozitív	negatív	pozitív
8.	negatív	pozitív	**	**

Jelmagyarázat: * a CMV vizsgálatban nem vett részt
 ** a labor IgG ellenanyag meghatározást nem végzett
 ■ A dőlt betűvel írt eredmények az elvárttól eltérő eredmények (lásd szöveg)

A CMV vizsgálatok meghatározására használt módszerek:

CMV IgM	CMV IgG	Módszer
Dia-Sorin ETI-CYTOK-M revers PLUS	Dia-Sorin ETI-CYTOK-G PLUS	ELISA – PP65
Trinity-Captia	Trinity-Captia	ELISA
LIAISON Dia-Sorin CLIA CMV- IgM	LIAISON Dia-Sorin CLIA CMV-IgG	Chemiluniscencent immunoassay
Dia.Pro	Dia.Pro	ELISA
Biotest IgM plus	Biotest IgG recombinant	ELISA – gB glikoprotein



A minőségellenőrző eljárások a szerológiai vizsgálatoknál egy folyamatos minőségbiztosítási, belső, külső minőségellenőrzési tevékenységet feltételez, melyben a laboratórium munkatársainak részvétele magas szintű, és ahol a belső folyamatok pontosan ismertek, és tényeken nem pedig szokásokon alapulnak.

- - méri hol tart a rendszer
- - segít feltárni és megérteni az eltéréseket
- - ösztönzi a megoldásokat

Jártassági körvizsgálat 2005.

Bodonyi Anna, Visontai Ildikó, Molnár Annamária

Országos Epidemiológiai Központ; Minőségbiztosítási osztály

Intézetünk 2005-ben ismét meghirdette a mikrobiológiai laboratóriumok részére a „Jártassági Körvizsgálatot.” Az eddigi bakteriológiai tenyésztési és parazitológiai vizsgálatokat mikológiai és szerológiai vizsgálatokkal bővítettük ki. Magyarországon a körvizsgálatok beindítása, megszervezése, összeállítása a minőségbiztosítás részeként Dr. Lányi Béla nevéhez fűződik. A vizsgálatok gyakorisága, illetve a minták száma, lebonyolítása az évek során változott, többféle módon történt. 2005-ben és (2006-ban is) két alkalommal adtunk ki teszt-preparátumokat, amely vizsgálatokból az alábbi lista szerint lehetett választani.

Bakteriológiai tenyésztés, antibiotikum érzékenység vizsgálat	2x3 db minta
Bakteriológiai szerológia Mycoplasma pneumoniae antitest kimutatás	2x2 db szérumszám
Mikológiai tenyésztés, gomba azonosítás, antimycotikum érzékenység meghatározás	2x3 db minta
Parazitológiai mikroszkópos vizsgálat Plasmodium sp. kimutatása	2x2 db vérkenet
Parazitológiai szerológia Toxoplasma IgM, IgG, IgA, IgG aviditás	2x5 db szérumszám
Vírus szerológiai vizsgálat Hepatitis A anti HAV-IgM	2x4 db szérumszám
Vírus szerológiai vizsgálat Hepatitis B HBsAg	2x4 db szérumszám
Vírus szerológiai vizsgálat Hepatitis B anti HBs	2x5 db szérumszám
Vírus szerológiai vizsgálat Hepatitis B anti HBc	2x3 db szérumszám
Vírus szerológiai vizsgálat Hepatitis C anti HCV	2x4 db szérumszám
Vírus szerológiai vizsgálat Epstein Barr vírus IgG, IgM	2x2 db szérumszám
Vírus szerológiai vizsgálat Cytomegalovírus IgG, IgM	2x2 db szérumszám

2005. második felében - a PHARE támogatás keretében - lehetőség nyílt vizsgálati palettánk bővítésére további szerológiai körvizsgálatok bevezetésével a regionális laboratóriumok akkreditációs programjának elősegítése céljából.

Ezek a vizsgálatok a következők voltak:

HIV Ag/At

Helicobacter pylori IgG

Herpes simplex vírus (HSV-1) IgG és IgM

Herpes simplex vírus (HSV-2) IgG és IgM

Varicella Zoster vírus (VZV) IgG

Rubeola vírus IgG és IgM

Treponema pallidum IgG

Syphilis Rapid Plasma Reagin (RPR)

A mikrobiológiai jártassági körvizsgálatok szervezését, bonyolítását és koordinálását az OEK Minőségbiztosítási osztálya végzi 2005. májusa óta. A résztvevő laboratóriumok anonimitását az osztály a központi iktatás bevonásával valósította meg. Az érintett laboratóriumokat a központi iktatásért felelős, titoktartási nyilatkozatot aláíró munkatárs látja el kódszámmal, így a kódokat Intézetünkben kizárólag a postai érkeztesért felelős és egyben a kódszámot kiosztó munkatárs ismeri. Az értékelő laboratóriumokban az értékelést végző munkatársak a laboratóriumokból visszaküldött eredményeket csak kódoltan kapták meg. Az anonimitás fenntartásának lényeges eleme volt, hogy a résztvevő laboratóriumok a kiértékelő lapot kizárólag postán juttassák vissza és az eredményközlő lapon csak a laboratóriumi kódszámot tüntessék fel.

A kiküldött, körvizsgálatban szereplő szerológiai minták HIV és hepatitis negatívak voltak. A Minőségbiztosítási osztály a jelentkezések összegzése után, a vizsgálati anyagokat laboratóriumok szerint csoportosította. A körvizsgálati anyagok mellett egységesített kísérőlapok, OEK nevére szóló válaszboríték, és az Iktatóban lezárt, a laboratórium kódszámát tartalmazó boríték volt. A „Jártassági Körvizsgálatra” jelentkezett mikrobiológiai laboratóriumok képviselői a megfelelő szállítólevél aláírása után a mintákat és dokumentációt az OEK Minőségbiztosítási osztályán vehették át.

A megfelelő határidőre visszaérkezett eredményeket tartalmazó borítékokat az Iktatóban bontották, ettől kezdve az Iktató ezeket csak kódszámmal jelzeten továbbította. A kiértékelést a különböző körvizsgálatokat összeállító munkatársak végezték el, az elért eredményeket megfelelő pontszámmal, vagy százalékban kifejezve.

Az 2005. évi vizsgálatok lezárása után a laboratóriumok a részvételtől igazolást kaptak:

IGAZOLÁS **jártassági körvizsgálatban való részvételtől**

Igazolom, hogy a **laboratóriuma** a 2005. évi mikrobiológiai jártassági körvizsgálatban részt vett a mellékeltek szerint.

A laboratórium kódszáma:

Budapest,

Dr. Melles Márta
főigazgató főorvos

Az igazolás a laboratórium kódszámát igazoló dokumentummal együtt bizonyította az adott laboratórium részvételét a körvizsgálatban.

2005. évben a jártassági körvizsgálatban 35 laboratórium, 18 ÁNTSZ, illetve 17 kórházi mikrobiológiai laboratórium vett részt, de mivel év közben a résztvevő ÁNTSZ laboratórium közül hat megszűnt, ezért a vizsgálat második részében már csak 29 résztvevő volt.

Részvétel az egyes vizsgálatokban:

Vizsgálatok		Résztevő laboratóriumok	
		2005/I.	2005/II.
bakteriológiai tenyésztés		35	29
bakteriológia szerológia /mycoplasma/		10	7
mikológiai tenyésztés		13	10
parazitológia	vérparaziták mikroszkópos kimutatása	12	6
	szerológia /toxoplasma/	16	11
vírus szerológia	hepatitis	18	13
	EBV-CMV	6	6
	HSV-1, HSV-2	-	1
	VZV	-	2
	rubeola	-	1
	treponema	-	3
	RPR	-	2
	HIV	-	5

2005. I-II. körvizsgálat eredményeinek összehasonlítását a következők táblázatokban foglaltuk össze:

Bakteriológia tenyésztés				
Beküldő laboratórium kódja	2005. I. körvizsgálat pontérték	% 2005.I. körvizsgálat	2005. II. körvizsgálat pontérték	% 2005.II. körvizsgálat
267	17	56	23	76
268	23	76	24	80
269	26	86	27	90
270	24	80	26	86
271	25	83,3	27	90
272	28	93,3	28	93,3
273	23	76	27	76
274	21	70	27	76
275	22	73,3	-	-
276	22	73,3	-	-
277	30	100	-	-
278	24	80	-	-
279	26	86	27	76
280	27	76	28	93,3
281	27	76	-	-
282	25	83,3	21	70
283	26	86	27	76
284	19	63,3	-	-
285	28	93,3	20	66,6
286	14	46,6	7	23,3
287	29	96,6	30	100
288	30	100	29	96,6
289	16	53,3	21	70
290	11	36,6	16	53,3
291	23	76	21	70
292	28	93,3	29	96,6
293	27	76	26	86
294	25	83,3	28	93,3
296	12	40	23	76
297	15	50	24	80
298	17	56	13	43,3
299	29	96,6	28	93,3
300	29	96,6	29	96,6
325	27	76	21	70
327	17	56,6	10	33,3

Maximális pontszám: 30 (jutalom pont nélkül)

A Bakteriológiai tenyésztéses körvizsgálat mindkét részében 80%-nál jobb eredményt 10 laboratórium, 50%-nál rosszabb eredményt csak egy laboratórium teljesített.

Mycoplasma				
Beküldő laboratórium kódja	Pont érték 2005. I. körvizsgálat	% 2005. I. körvizsgálat	Pont érték 2005. II. körvizsgálat	% 2005. II. körvizsgálat
269	25	35,7	55	78,5
272	22	31,4	55	78,5
274	53	75,7	58	82,85
275	30	42,8	-	-
282	14	20	-	-
284	8	11,42	-	-
285	70	100	69	98,6
286	14	20	12	17,14
287	65	92,8	53	75,7
289	12	17,4	52	74,3

Elérhető maximális pontszám: 70 pont

Ennél a vizsgálatnál 80%-nál jobb eredményt 1, 50%-nál rosszabb eredményt szintén egy laboratórium ért el.

Mycológia						
Beküldő laboratórium kódja	Elérhető maximális pontszám I. körvizsgálat	Pont érték 2005. I. körvizsgálat	% 2005. I. körvizsgálat	Elérhető maximális pontszám II. körvizsgálat	Pont érték 2005. II. körvizsgálat	% 2005. II. körvizsgálat
269	51	36	70,6	45	37,15	82,5
271	51	31,25	61,27	45	34,88	85,07
272	51	28,67	56,21	45	32,00	71,1
274	51	37,38	73,29	45	39,00	86,6
277	51	38,07	74,64	45	-	-
278	51	37,33	73,2	45	-	-
282	51	30,60	60,00	45	28,32	62,9
284	51	31,00	60,78	45	-	-
285	51	39,75	77,9	45	41,63	92,5
291	51	29,33	57,5	45	25,00	55,5
298	51	27,00	52,9	45	34,00	75,5
299	51	38,07	74,64	45	31,00	68,8
300	51	-	-	45	40,69	90,4

A Mycológiai körvizsgálat mindkét részében résztvevő laboratóriumok 80%-nál jobb, illetve 50%-nál rosszabb eredményt egy laboratórium sem teljesített.

Vérparaziták mikroszkópos kimutatása		
Beküldő laboratórium kódja	2005. I. körvizsgálat megfeleléség	2005. II. körvizsgálat megfeleléség
267	Igen	-
269	Igen	Igen
270	Nem	-
273	Igen	Igen
274	Igen	Igen
275	Igen	-
277	Nem	-
280	Igen	Nem
281	Igen	-
284	Igen	-
285	nem	Igen
300	-	Igen

Toxoplasma		
Beküldő laboratórium kódja	2005. I. körvizsgálat megfeleléség	2005. II. körvizsgálat megfeleléség
267	Igen	Igen
268	Igen	Igen
269	Igen	Igen
270	Igen	Igen
272	Igen	Igen
273	Igen	Igen
274	Igen	Igen
275	Nem*	-
277	Igen	-
278	Igen	-
279	Igen*	Igen*
281	Igen	-
282	Igen	Igen
283	Igen	Igen
284	Igen	-
285	Igen	Igen

* 275-ös kódszámú laboratóriumnál az 5 tesztpreparátumból 1 felelt meg

* 279-es kódszámú laboratóriumnál az 5 tesztpreparátumból 4 felelt meg

A táblázatokból látható, hogy a mikroszkópos vizsgálatnál 3 laboratórium, míg a szerológiai vizsgálatoknál az összes résztvevő teljesítése megfelelő volt.

Hepatitis						
Beküldő laboratórium kódja	Elérhető maximális pontszám	Pont érték 2005. I. körvizsgálat	% 2005. I. körvizsgálat	Elérhető maximális pontszám	Pont érték 2005. II. körvizsgálat	% 2005. II. körvizsgálat
267	49	42	85,71	49	49	100
268	28	28	100	28	28	100
269	49	47	95,92	49	48	98
270	43	41	95,35	43	43	100
271	49	45	91,84	49	49	100
272	28	28	100	34	33	97
273	43	40	93,02	43	43	100
274	49	45	91,84	49	49	100
275	18	18	100	-	-	-
276	28	27	96,43	-	-	-
277	28	28	100	-	-	-
279	43	41	95,35	43	43	100
280	18	18	100	18	18	100
281	20	18	90	-	-	-
282	43	30	69,77	41	43	100
283	28	28	100	34	28	100
284	28	24	85,71	-	-	-
285	49	49	100	49	49	100

A 13 Hepatitis szerológiában résztvevő laboratórium közül 12 résztvevő ért 80%-nál jobb eredményt, a leggyengébb teljesítmény is csak 69,77% volt.

EBV-CMV				
Beküldő laboratórium kódja	Pont érték 2005. I. körvizsgálat	% 2005. I. körvizsgálat	Pont érték 2005. II. körvizsgálat	% 2005. II. körvizsgálat
269	30	75	35	87,5
271	25	62,5	40	100
272	40	100	40	100
274	40	100	35	87,5
279*	20	100	20	100
282	40	100	35	87,5

* a laboratórium csak CMV ellenanyag kimutatást végzett.

EBV-CMV vírus szerológiai körvizsgálat mindkét részében 80%-nál jobb eredményt négy laboratórium ért el, a legrosszabb eredmény 62,5%-os teljesítés volt.

HIV	
Beküldő laboratórium kódja	2005. II. körvizsgálatmegfelelősége
213	igen
268	igen
269	igen
271	igen
283	igen

Ez a körvizsgálat csak 2005. év második felében indult az 5 régiós laboratórium részvételével. Mind az öt laboratórium teljesítése megfelelő volt.

TORCH			
Beküldő laboratórium kódja	Elérhető maximális pontszám	Pont érték 2005. II. körvizsgálat	% 2005. II. körvizsgálat
213	60	45	75
269	50	50	100
283	20	10	50

A TORCH körvizsgálatban egy laboratórium 80% felett teljesített és egy laboratórium 50%-os teljesítményt ért el.

Összefoglalva a 2005. évi (I-II.) jártassági körvizsgálatban a bakteriológiai tenyésztéses vizsgálatban a jelentkezett laboratóriumok mindegyike, míg a vírus szerológiai vizsgálatnál csak az ÁNTSZ laboratóriumai, illetve a második részben az SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet vett részt. A 35, illetve a 29 résztvevő laboratórium átlag teljesítménye a következő táblázatban látható.

Vizsgálatok		2005/I. résztvevő laborok száma	Átlag teljesítmény %	2005/II. résztvevő laborok száma	Átlag teljesítmény %
bakteriológiai tenyésztés		35	75,56	29	76,92
bakteriológia szerológia /mycoplasma/		10	44,72	7	72,23
mikológiai tenyésztés		13	66,08	10	77,09
parazitológia*	vérparaziták mikroszkópos kimutatása	11	72,73	6	83,33
	szerológia /toxoplasma/	16	93,75	11	100
vírus szerológia	hepatitis	18	93,94	13	99,62
	EBV-CMV	6	89,58	6	93,75
	HSV-1, HSV-2	-	-	1	62,5
	VZV	-	-	2	100
	rubeola	-	-	1	100
	treponema	-	-	3	100
	RPR	-	-	2	50
	HIV*	-	-	5	100*



(*) A csillaggal jelölt vizsgálatok esetében az eredmények értékelésénél nem készíthető %-os kimutatás (az eredmény megfelelő, vagy nem megfelelő), így a fenti táblázatban az átlagteljesítmény oszlop a megfelelő eredményt beküldők százalékos megoszlását jelzi.

Minimális gátló koncentráció meghatározása Etest-tel

Gacs Mária, Tirczka Tamás

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat pontosabb, és megbízhatóbb módja a minimális gátló koncentráció (MIC) értékének meghatározása. A MIC az antibiotikumnak az a legkisebb mennyisége, amely 1 ml térfogatban gátolja egy adott baktérium törzs szaporodását.

Súlyos infekciókban egyre inkább felmerül a kitenyésztett kórokozó esetében szóba jöhető antibiotikumok MIC értéke meghatározásának szükségessége. Egyrészt pontosabb, biztosabb eredmény nyújt az adott antibiotikum terápiás használhatóságát illetően, másrészt segítséget ad az adott kórokozóval szemben várhatóan leginkább eredményesen használható antibiotikum kiválasztásához.

Az antibiotikumok farmakokinetikus és farmakodinámiás sajátosságainak ismerete és a MIC érték felhasználásával számított különböző indexek C_{max} MIC (az a vérben elérhető csúscsökkentés, ami a MIC érték felett van), $T > MIC$ (az időtartam, amikor a vérben lévő antibiotikum koncentráció a MIC érték felett van), AUC/MIC (Area Under plasma Concentration/MIC, (a plazma koncentráció görbéje alatti terület/MIC) segítségével kiválasztható az adott beteg terápiájában legeredményesebben használható antibiotikum.

Mikrobiológiai szempontból indokolt a minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározása:

- mindazon esetekben, amikor a kórokozó baktérium antibiotikum érzékenységének vizsgálatára a korongdiffúziós módszer a CLSI ajánlása alapján nem alkalmas (lassan növekvő baktérium, rosszul diffundáló antibiotikum)
- az anaerob baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálatára
- a *Streptococcus pneumoniae* penicillinnel szembeni rezisztenciája mértékének meghatározására
- meghatározott rezisztencia mechanizmusok fenotipos vizsgálata esetében,
- s amikor bizonyos rezisztencia mechanizmusok csak a MIC érték meghatározásával ismerhetők fel pl.: staphylococcusok, enterococcusok glikopeptidekkel szembeni alacsony szintű rezisztenciája.

A MIC meghatározás legegyszerűbb módja, amely a mindennapi rutinban is könnyen kivitelezhető az Etest vizsgálat.

Az Etest-tel végzett minimális gátló koncentráció meghatározást egyre szélesebb körben alkalmazzák, egyszerű kivitelezhetősége, minimális eszközigénye miatt és mivel a széles koncentráció gradiens pontos MIC értéket ad. Ma már egyes rezisztencia mechanizmusok fenotipos vizsgálatára alkalmas tesztek is forgalomba vannak (ESBL, MBL)

Az Etest MIC, a minimális gátló koncentráció (MIC) értékének meghatározása az adott antibiotikum koncentrációjának exponenciális gradiensevel átitatott és jelölt tesztesikkel, amely a hagyományos MIC módszer 15 kettősléptékű hígításának megfelelő koncentráció range biztosít. Az Etest egy vékony nem porózus plasztik csík, amelynek egyik oldalán a MIC érték skála, másik oldalára az előre meghatározott antibiotikum koncentrációjának exponenciális gradiense van. Az Etest a svéd AB BIODISK terméke.

A termék validálását 3000 tanulmány, 900 tudományos folyóiratban megjelent cikk, előadások jelentős tudományos kongresszusokon, több nagy mikrobiológiai kézikönyv, köztük az általunk is használt „Manual of Clinical Microbiology” több kiadása biztosítja. Az „Etest Technical Manual”, tartalmazza az ajánlott táptalajokat, az inokulum sűrűséget, s inkubációt és a szükséges kontroll törzseket is.

A módszer más MIC meghatározások, leves-hígításos és a gold standardnak tekinthető agar-hígításos módszer eredményeivel jól korrelál, de mindkettőnél jóval könnyebb

kivitelezhetősége miatt, a tudományos közlemények mellett, a rutin eljárásokban is jól használható.

A korongdiffúziós módszernél többet nyújt, mivel MIC értéket ad meg,

Előnyei:

Kvantitatív eredményt ad széles koncentráció range-ben.

Az eredmények jól reprodukálhatóak.

A gyártó által különböző törzsek vizsgálata lényeges egyezést (essential agreement EA $\geq 90\% \pm 1$ hígítás) mutatott az NCCLS/ CLSI referens agar- és leveshígításos módszerekkel.

A táptalajra helyezett tesztsíkból a koncentráció gradiensnek megfelelő mennyiségben kiáramló antibiotikum, - amely a csík alatt stabilan megmarad - és a növekedő tenyészet, a csík két oldalán egy ellipszoid alakú gátlási zónát eredményez. Ahol, a zóna alsó, elkeskenyedő vége metszi a tesztsíkot, a skáláról leolvasható a MIC érték $\mu\text{g/ml}$ -ben. .

A minta a vizsgálandó baktérium 18-24h tenyészete.

Leggyakrabban vizsgáltak:

- a súlyos klinikai esetekből izolált, érzékenyebb, nehezebben tenyészthető baktériumok pl. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *alfa haem Streptococcus*, s minden más kórokozó, ha felmerül az AUC/ MIC, Cmax/MIC, T>MIC megállapításának szükségessége
- a penicillinre nem érzékeny *Streptococcus pneumoniae* izolátumok penicillin és minden β -laktámra való érzékenysége
- MRSA, VRE gyanús törzs, ESBL, MBL (metallo- β -laktamáz) termelésre utaló rezisztenciájú tenyészet.
- a vancomycin screen lemezen növekedő *Enterococcus* spp. és *Staphylococcus aureus* tenyészet

Kivitelezési eljárás

Előkészítő műveletek:

A szükséges táptalajokat (lásd az Etest Technical Manual adott baktériumra vonatkozó előírásait) szobahőre helyezük, megtekintjük, hogy nem szennyezettek-e, az agarlemez felszíne, vastagsága megfelelő-e ($4 \pm 0,5$ mm); a nem megfelelőeket a vizsgálatból kizárjuk.

A vizsgálathoz szükséges Etest csíkokat előkészítjük, ha a csomagoláson feltüntetett jelölés szerint hűtőben vagy mélyhűtőben tároltuk, felbontás nélkül - a hűtőben lévőket 1-2h-ig, a mélyhűtőből kivettek még hosszabb? ideig szobahőn tartjuk a páralecsapódás elkerülésére.

A vizsgálathoz szükséges számú Wasserman csőbe csövenként 3 ml steril fiz. NaCl oldatot mérünk. A csövekre és lemezekre ráírjuk a minták azonosító számát.

Dokumentáció: a táptalaj, a fiz.- NaCl oldat azonosítója és az Etest-ek sarzsszáma a munkalapon kerülnek rögzítésre.

I.-II. Az inokulum készítése és az inokulum leoltása

A vizsgálandó törzs 18-24h szintenyészetéből az adott kórokozóra vonatkozó CLSI M100-S15 és az E-test Technical Manual előírásai szerint 0,5, 1, vagy 2 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítünk. A további részletek megegyeznek az Mikrobiológiai Körlevél előző számában megjelent <Aerob kórokozó baktériumok antibiotikum érzékenységének meghatározása korongdiffúziós módszerrel> leírásban.

III. Az Etest-csíkok felhelyezése

A leoltott lemezeken 15' belül kell elhelyezni az előkészített Etest csíkokat. A csíkra felvitt antibiotikum nevének rövidítése minden tesztszíkon látható. A rövidítések jegyzékét lásd a forgalmazó listáján.

Az Etest-ekhez csomagolt használati utasítás részletesen leírja a kivitelezés lépéseit.

Az Etest csomagok felbontáskor le kell vágni a fóliacsomag végét, kivesszük a szükséges mennyiségű csíkot, s amelyre nincs szükségünk visszahelyezzük a fóliacsomagba. A csíkokat steril csipesszel úgy vesszük ki a tartóból, hogy közben ne érintsük a csík skálával ellentétes oldalát. Az inokulummal fedett táptalajra steril csipesszel ráfektetjük a vizsgálni kívánt antibiotikum Etest csíkját, úgy hogy a csík antibiotikum koncentráció gradienssel fedett oldala teljes hosszában a táptalajhoz simuljon, a MIC skála nézzen felfelé. Fontos, hogy ha a csík már a táptalajt borító tenyészethez ért, ne mozdítsuk el, s ne maradjon levegő buborék a csík alatt. A 90 mm átmérőjű Petri-csészében lévő táptalajra legfeljebb 2 Etest helyezhető el, vagy V alakban, vagy párhuzamosan egymással ellentétes irányban. Egy lemezre nem helyezhető két olyan azonos típusú antibiotikumot tartalmazó Etest, melyek egyike gátlószert is tartalmaz (pl. ampicillin és amoxicillin/clavulánsav), és ezzel befolyásolhatja a másik Etest eredményét.

IV. Inkubáció:

A lemezeket megfordítva, 15 percen belül a CLSI M100-S15 M2-A8 előírásának megfelelő miliőt és hőfokot biztosítva inkubáljuk. A továbbiakat lásd az *<Aerob kórokozó baktériumok antibiotikum érzékenységének meghatározása korongdiffúziós módszerrel>* c. leírás ugyanezen pontjában.

Minőség-ellenőrzés

Az Etest Technical Manual és az Etest-ekhez a forgalmazó által csatolt melléklet megadja a CLSI szerint szükséges kontroll törzseket, s ezek Quality Control Ranges értékeit, ezek az értékek azonosak a CLSI M-100 S-15 A7 A6 3-3A táblázatának adataival.

A CLSI M100-S15 előírás szerint kontrollálni kell minden az antibiotikum érzékenységi vizsgálatnál használt, újonnan főzött táptalaj sarzsot, és minden újonnan használatba kerülő E-test csíkot lot-onként. A vizsgálat eredményéről, s ennek alapján a megfelelőségéről jegyzőkönyvet kell készíteni, s ezt a vizsgálatok időrendjében lefűzni.

Mivel ezek a vizsgálatok nem napi rendszerességgel történnek, s általában csak egy-két antibiotikumra vonatkozó MIC vizsgálat szükséges, ezért az adott ATCC kontroll törzssel minden alkalommal elvégezzük a táptalaj/Etest vizsgálat kontrollját, s ennek eredményét, a táptalaj azonosítót és Etest azonosítót az egyidejűleg végzett vizsgálatokkal együtt a munkalapon rögzítjük. (Amennyiben a korongdiffúzióhoz kontrollált táptalajt használunk természetesen a táptalaj kontroll elmaradhat.)

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz szükséges kontroll törzseket is ellenőrizni kell. A kontroll törzsek ellenőrzésének dokumentációját lásd a 2. számú mellékletben.

A vizsgálat eredményének értékelése

Az inkubációs idő letelte után a vizsgálatot kérő diplomás értékeli az eredményeket.

- Első lépésként megtekintti a vizsgálatnak megfelelő kontroll törzssel kapott Etest MIC eredményt, amennyiben ez a CLSI M100-S15 M7-A6 sz. táblázata által megadott range-n belül van a munkalapon rögzíti, és leolvassa a vizsgálandó törzsek MIC értékeit is.

- A MIC érték $\mu\text{g/ml}$ -ben a csíkon lévő MIC skáláról leolvasható, ahol a gátlási zónaként kialakult elipszoid elvékonyodó alsó vége metszi az Etest csíkot. A könnyebb értékelhetőség

miatt az Etest-csikon a MIC skála sűrűbb a kettős léptékű hígítási értékeknél, tehát ha közti értékre esik a metszéspont, minden esetben a felette lévő kettős hígítási értéket kell megadni.

- A kapott értékeket a CLSI M100-S15 M7 A6 táblázatainak megfelelően érzékeny, mérsékelt érzékeny és rezisztens kategóriába sorolja.

Az Etest módszerrel végzett MIC meghatározás jól összehasonlítható eredményt ad más módszerekkel, köztük a gold standard-nek tekinthető lemezhígítással. Az eredmény értékelését nehezítő tényezők:

- a gátlási zóna és az Etest-csík metszéspontja nem mindig éles határu,
- a zónán belül elszórtan növekedés látható.

A fenti jelenségeknek a vizsgált baktérium sajátjaiból adódóan több oka lehet. A metszéspont, azaz a növekedés pontos határa gyakran elsősorban a bakteriosztatikus szerek esetében nehezen megállapítható, s ez bizonytalanná teheti a 'leolvasást'.

A gátlási zónán belül növekedő telepek heterorezisztenciát jelölhetnek, az értékeléskor mindig csak a teljesen növekedésmentes zóna vehető figyelembe. A zónán belül növekedő telepeket ki kell szélesíteni, s a vizsgálatot, amennyiben a tenyészet az eredetivel azonos meg kell ismételni. Ugyancsak megisméltendő a vizsgálat, ha a csík két oldalán a növekedés és a csík metszéspontja közt jelentős eltérés van. Kisebbségi eltérés esetén a magasabb értéket olvassuk le. Minden Etest csomaghoz a gyártó mellékel egy magyar nyelvű használati utasítást, és táblázatokat az értékeléshez. A MIC érték helyes megállapítását külön aktuális kiadványok és képek is segítik.

A további, értékelésnél figyelembe veendő szempontokat lásd az <Aerob kórokozó baktériumok antibiotikum érzékenységének meghatározása korongdiffúziós módszerrel> c. összeállítás megfelelő pontjában.

A vizsgálat reprodukálhatósága a nemzetközi körvizsgálatokat bonyolító WHO értékelés szerint is \pm egy hígítási fok eltéréssel elfogadott.

Váratlan vagy szokatlan eredmény esetén a vizsgálat ismétlése indokolt, ha az ismétlés során ugyanazt a nem várt eredményt kapjuk, más módszert alkalmazása javasolt (leves vagy lemezhígítás) a MIC érték meghatározására. A szokatlan, ritkán észlelt rezisztenciát minden esetben ajánlott molekuláris vizsgálatokkal konfirmálni (pl. imipenem rezisztens *Enterobacteriaceae*). Beküldendő az OEK Bakteriológia I. osztályra.

Az eredményt befolyásoló tényezők

Az eredményt befolyásolhatja mindaz, amely az <Aerob kórokozó baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálata korongdiffúziós módszerrel> c. összeállításban leírásra került. Ezeket túl befolyásolhatja az eredményt még:

- Az Etest-csík tárolása felhasználásig, lásd az "Etestek tárolásának módja" c. mellékletet
- az antibiotikum koncentráció gradiensét tartalmazó csík (Etest) táptalajra helyezésének módja
- a leolvasó diplomás szakmai ismeretei és gyakorlottsága az Etest-ek értékelésében

Hibák és hibaelhárítások

A hibák jelentős része megegyezik az <Aerob kórokozó baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálata korongdiffúziós módszerrel> c. összeállításban leírtakkal.

Nem megfelelő eredményt adhat a fentiekén kívül

ha csíkok felhelyezése a táptalajra nem megfelelő:

- légrés vagy légbuborékok maradnak a szuszpenzióval borított táptalaj és a plasztik csík között
- miután a csík már érintkezett a szuszpenzióval elmozdítják

Hibaelhárítás:

azokban az esetekben, amikor a leolvasó a leírt hibák következményeit észleli, a vizsgálatot gondos kivitelezéssel meg kell ismételtetni, a hibát elkövető ismereteinek felelevenítésével.

Ha a MIC érték leolvasása nem történik megfelelően:

- amikor a gátlási zóna és a tesztsík metszésvonala nem éles, a növekedési zóna a csík mellett elkeskenyedve lehúzódik, a csík két oldalán a metszéspont eltérő magasságban van és a „leolvasó” nem veszi figyelembe a vizsgált specieshez kiadott Etest értékelő segédanyagban leírtakat
- az értékelő nem veszi figyelembe a gátlási zónán belül növekedő telepeket, amelyek heterorezisztenciát jelölhetnek
- MH véres táptalajon haemolizáló telepek esetében a haemolizist, s nem a növekedést tekinti metszéspontnak.

Hibaelhárítás:

Az eredményeket értékelő diplomás szakmai ismereteinek bővítése. Az Etest kiadványok, s az azokban közölt segédanyagok, illetve a változások rendszeres figyelemmel kísérése.

Eredmény validálása

A munkalapon lezárt eredmény számítógépben való rögzítése után, az adott területért felelős diplomás átnézi az eredményeket, s nevének feltüntetésével validálja azokat.

Az eredmények kiadása

A minimális gátló koncentráció értékét $\mu\text{g/ml}$ -ben a szokásos eredménylap formanyomtatványon adjuk meg, az adott antibiotikum a CLSI M100-S15 M7-A6 táblázataiban megadott értékhatároknak megfelelően, É (érzékeny) M (mérsékelten érzékeny) R (rezisztens) kategóriákba sorolva.

Az eredmények interpretálása

Az eredményben mindig a kettesléptékű hígításnak megfelelő koncentrációt adjuk meg, ez különösen fontos a határértékek közelében. Pl. a *S. pneumoniae* esetében a leolvasott $1,5 \mu\text{g/ml}$ -t, $2 \mu\text{g/ml}$ -nek értékeljük, s miután a mérsékelt érzékenység és rezisztencia breakpontja $2 \mu\text{g/ml}$, már rezisztensként interpretáljuk.

Az eredmények interpretálásakor egyes esetekben szükség lehet az exact MIC értékre a MIC-Breakpoint Quociens számításához. Azokat a kórokozó/antibiotikum vonatkozásokat, amikor ez fontos lehet lásd a mellékletében. A „Szituációk, amelyek követelnek exact MIC értékeket” c. táblázatban és az „MBQ szerinti interpretálás” ábráin.

Az eredmények interpretálásánál további figyelembe veendő szempontokat lásd az <*Aerob kórokozó baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálata korongdiffúziós módszerrel*> c összeállításban.

Referenciák

1. E-test Technical Manual 2002 és az AB Biodisk folyamatosan közölt tájékoztató kiadványai
2. CLSI/NCCLS M100-S15 M7-A6
3. Murray et al: 2003 Manual of Clinical Microbiology
4. Klinikai és Járványügyi Bakteriológia 1999
5. Mikrobiológiai Körlevél 2001/3, 2006/1
6. Baker, C.N., et al. 1991. Comparison of the Etest to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. JCM vol 29, no. 3 p. 533-538



7. Mohr J. et al 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling can help guide targeted antimicrobial therapy for nosocomial Gram-negative infections in critically ill patients
Diagnostic Microbiology and Infectious diseases 48(2): 125-130.

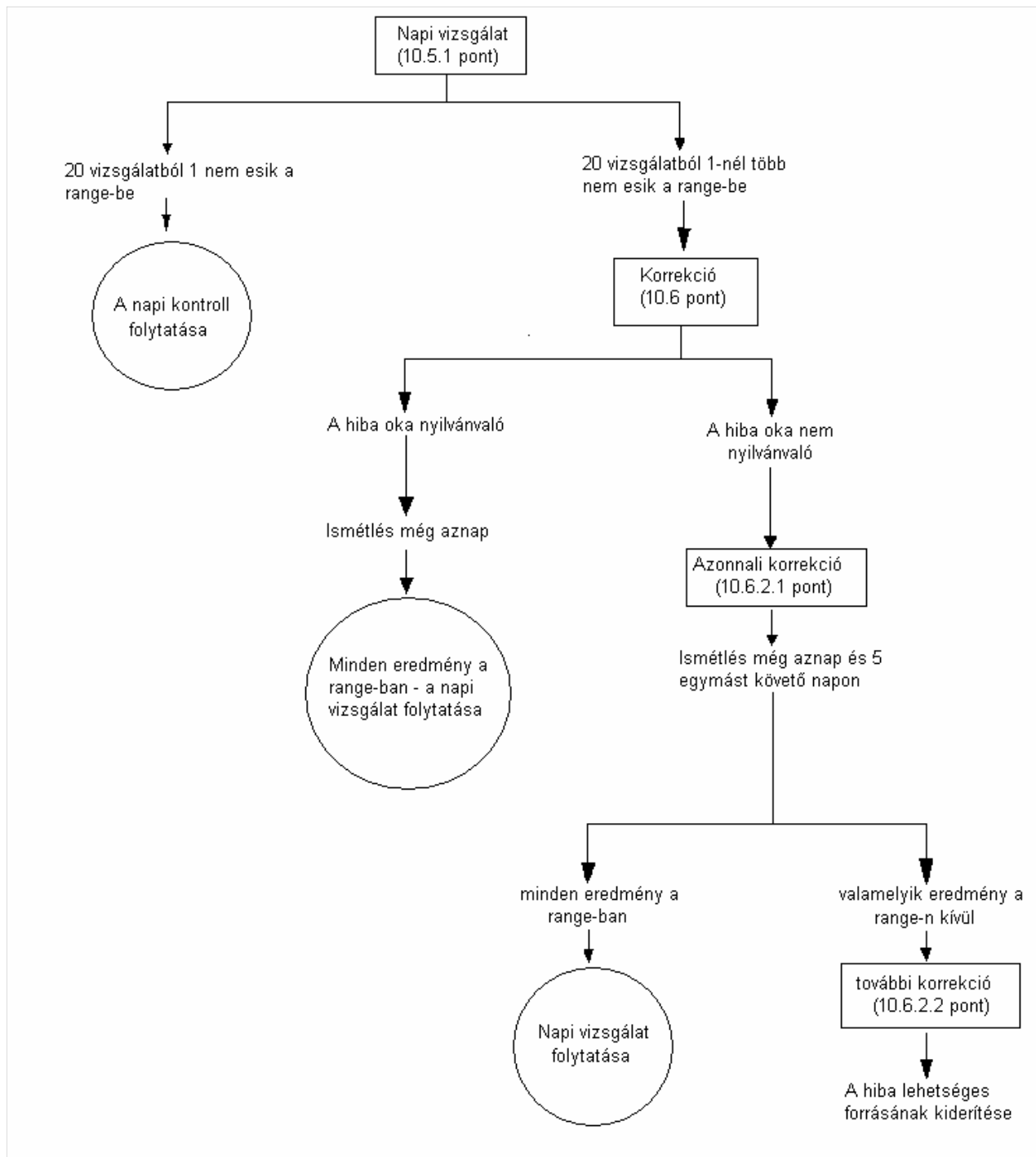
8. Paterson, D. (2006) The role of antimicrobial management programs in optimizing antibiotic prescribing within hospitals CID. 42 (suppl.2):S90-95

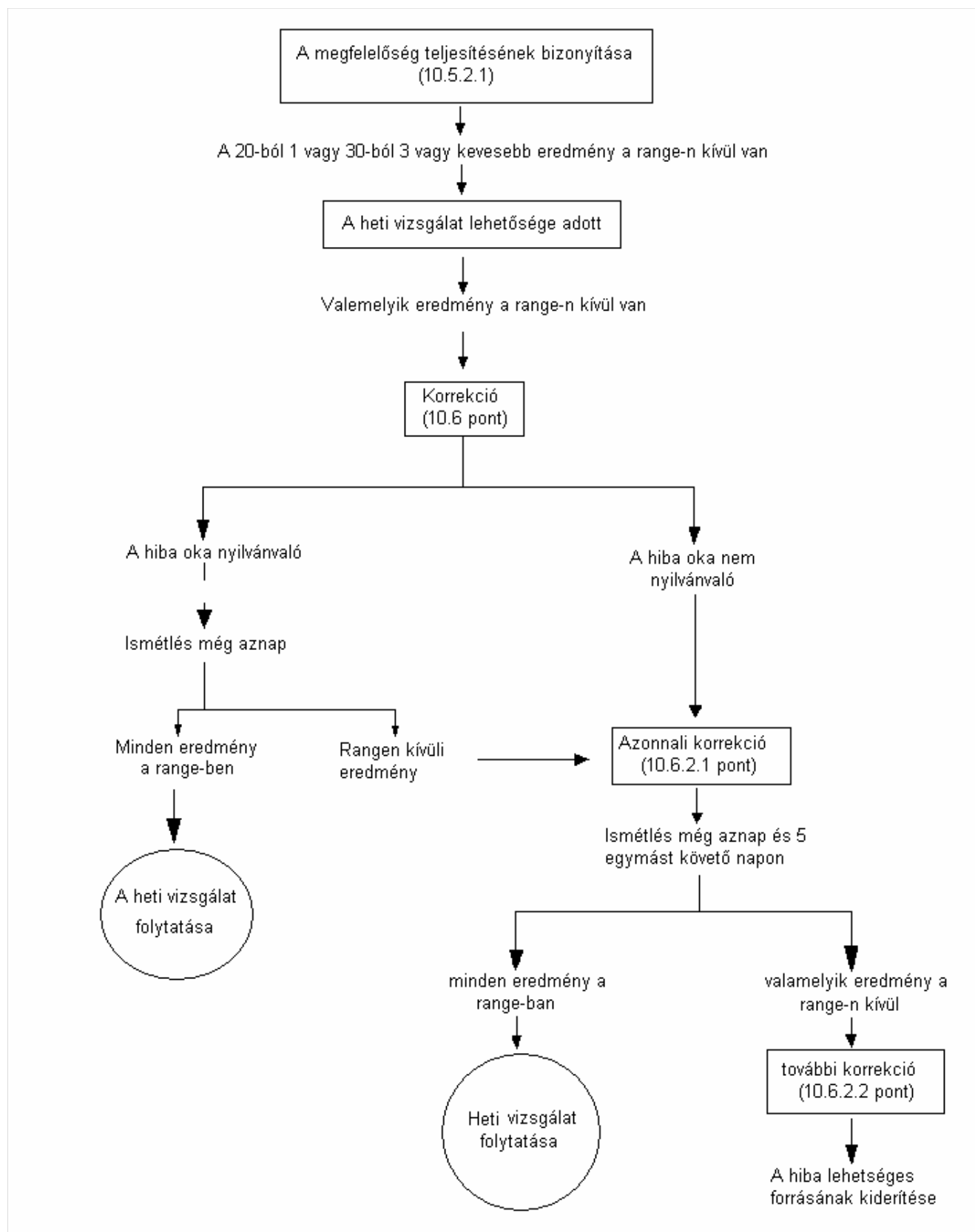
Mellékletek

1. A kontroll törzsek ellenőrzése
2. Az Etest-ek tárolásának módja
3. Exakt MIC meghatározás szükségessége (táblázat)
4. MIC Breakpoint Quotients (ábra)

1. számú melléklet

**A korongdiffúziós antibiotikum érzékenység quality kontroll vizsgálatának folyamatábrája a CLSI/NCCLS Standard M2-A8 alapján
A korongdiffúziós napi quality kontroll vizsgálat protokollja**





2. számú melléklet

Az Etest-ek tárolásának a módja

A bontatlan Etest csomagokat a csomagoláson feltüntetett hőfokon tiszta, száraz helyen tároljuk.

A mélyhűtőben tárolt csomagokat felbontás előtt, ha -20°C -on tároltuk kb. 30 percig, ha -70°C -on, 1 óra hosszat szobahőn tartjuk a pára lecsapódás elkerülésére.

A bontott csomagok fel nem használt csíkjait (strip) jól záródó tartályban nedvszívóval ellátva tároljuk.

Minden kinyitáskor ellenőrizzük a nedvszívó hatékonyságát a színváltozás figyelésével. Amennyiben az eredeti citromsárga szín narancsszínűre változik a nedvszívó korongot reaktiválni kell 60°C -on 5 óra időtartamig.

A bontott csomagokat amennyiben megfelelően tároltuk, nedvszívó használatával a lejárat idejük, azaz használhatóságuk megegyezik az eredeti csomagoláson feltüntetett időponttal.

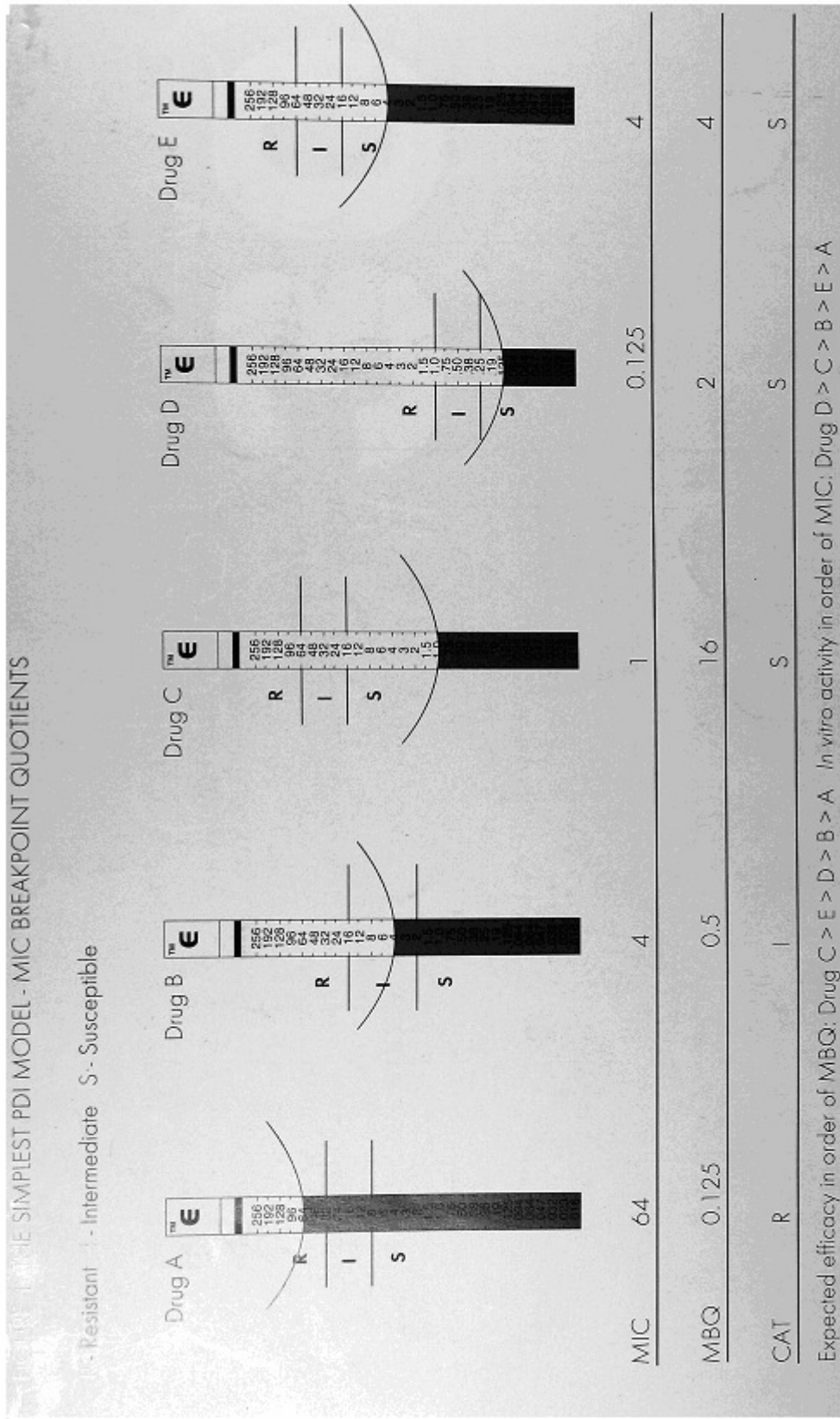
A tartályban az egyes csíkok sarzs számát (batch number) és lejárat idejét fel kell tüntetni.

3. számú melléklet

Példák azokra a szituációkra, amelyekben „exact MIC” eredményre szükség lehet

Baktérium/ szituáció	Antibiotikum	Megjegyzés
<i>Staphylococcus aureus</i>	vancomycin	VISA meghatározás MIC E-test vagy leveshígítási módszerrel 2-32 $\mu\text{g/ml}$ breakpoint esetén
<i>Enterococcus sp.</i>	vancomycin	VRE konfirmáció/jellemzés* MIC E-test, vagy leveshígítás <64 $\mu\text{g/ml}$
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	penicillin ceftriaxon	E-test vagy leveshígítás MIC $>0,064\mu\text{g/ml}$ penicillin, és 0,25-4 $\mu\text{g/ml}$ ceftriaxon esetében
<i>Streptococcus viridans</i>	penicillin ceftriaxon	E-test vagy leveshígítás MIC $>0,064\mu\text{g/ml}$ penicillin, és 0,5-4 $\mu\text{g/ml}$ ceftriaxon esetében
Anaerobok	Anaerobokra hatékony szerek	E-test vagy leveshíg. MIC teljes hígítási range-el (<i>Bacteroides spp.</i>)
Multirezisztens Gram-pozitívok	vancomycin, teicoplanin linezolid, quinupritin/ dalfopristin	E-test vagy leveshígítás MIC teljes hígítási range-el
Multirezisztens Gram-negatívok	minden szokásosan hatékony antibiotikum	E-test vagy leveshíg. MIC teljes hígítási range-el a dózis és adagolás optimális beállításához
Nem várt eredmény	minden szokásosan hatékony antibiotikum	Összehasonlítás a vad típus antibiogramjával ismétlés, küldés referens laboratóriumba

4. számú melléklet



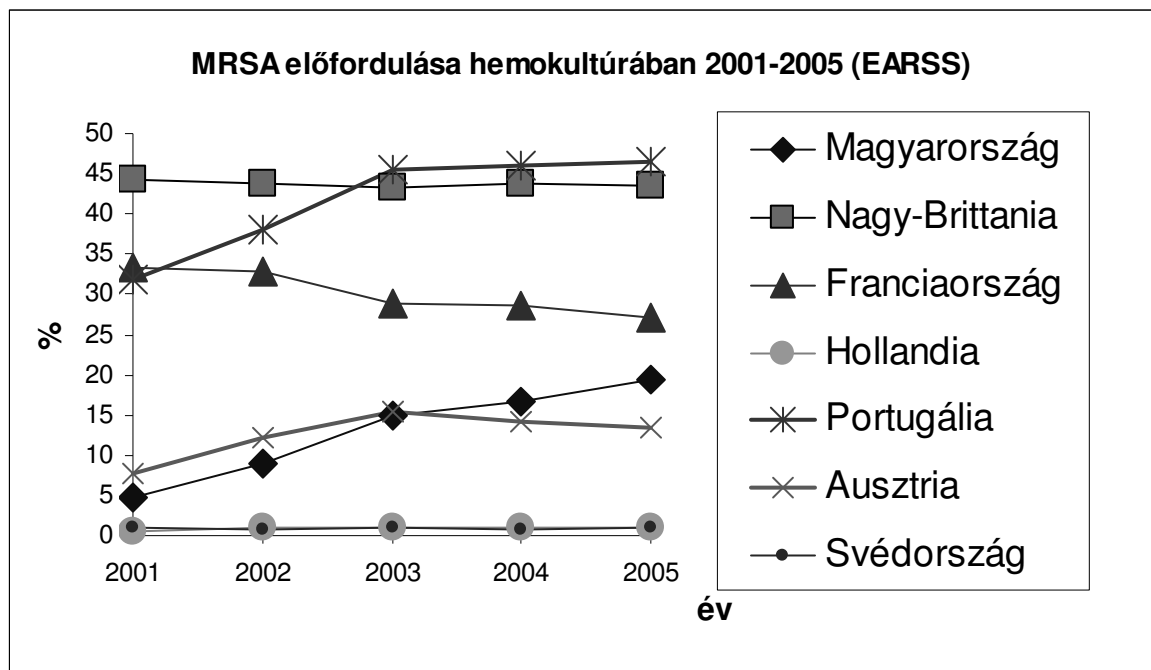
Új lehetőségek az MRSA-val vívott harcban Láthatáron egy új széles-spektrumú béta-laktám antibiotikum

2001 óta Magyarországon egyre súlyosabb problémát jelent az MRSA törzsek térhódítása. Az EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) kiadványai alapján, (melyek az OEK Antibiotikum Surveillance adatait tartalmazzák) a vérből izolált *Staphylococcus aureus* törzsek között a methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) aránya 2001 és 2005 között 5%-ról 20%-ra emelkedett, ahogy az 1. ábra mutatja. Ezen az ábrán láthatóak néhány nyugat- és dél-európai, valamint észak-európai állam MRSA adatai is. Feltűnő, hogy a nyugati államokban a MRSA magas aránya nem nőtt tovább az utóbbi években, sőt néhol enyhe csökkenés is tapasztalható, míg az északi országokban továbbra is igen alacsony az előfordulás gyakorisága.

Az antibiotikum surveillance adatai alapján 2005-ben Magyarországon 236 MRSA törzset izoláltak hemokultúrából (egy beteg/egy izolátum). Ezeknek a törzseknek 98,3%-a ciprofloxacinnra, 97%-a erythromycinre, 94,4%-a clindamycinre is rezisztens volt. Gentamicinre az izolátumok 56,7%-a bizonyult rezisztensnek. Glikopeptidekre mérsékelten érzékeny vagy rezisztens törzs (VISA/VRSA) nem volt. Az MRSA okozta súlyos infekciók arányának növekedése korlátozza az empirikus, vagy a célzott antibiotikum terápiás lehetőségeket. A közelmúltig a célzott terápiát csaknem kizárólag a glikopeptidek jelentették, melyek frekvenciált használata világszerte előrevetítette a VISA/ VRSA (valamint a VRE) törzsek megjelenését.

A fenyegető jövőkép Magyarországon is fontos kérdéseket vet fel: milyen irányban bővíthetnek az antibiotikum terápiás lehetőségek, milyen szerek lehetnek elérhetőek az elkövetkező években?

Jelen írásunk ezzel a kérdéskörrel foglalkozik, és részletesebben szól egy ígéretes, új antibiotikumról, a ceftobiprolról.



1. ábra

Először tekintsük át röviden, milyen újfajta antibiotikumok vannak jelenleg a piacon, melyek használatát már engedélyezték a világ több országában (köztük Magyarországon is).

Linezolid: oxazolidinon antibiotikum, hatását proteinszintézis gátlása útján éri el. Rendkívül jó hatása a Gram-pozitív kórokozókkal szemben (pl. MRSA, VISA és vancomycin rezisztens *Enterococcus faecalis* (VRE)), és jól penetrál a tüdőszövetbe is. A klinikai kísérletek alapján legalább olyan hatásos, mint a vancomycin, és pneumóniánál is jól használható. Igen ígéretes szer, azonban még kérdéses, hogy a hosszú távú kezeléseket mennyire jól tolerálják a betegek, és irodalmi adatok szerint már most nő a rezisztens törzsek száma.

Quinupristin-dalfopristin: a legtöbb Gram-pozitív kórokozó ellen hatásos félszintetikus streptogramin. Egy számos intézményben folyó vizsgálat szerint hasonló klinikai sikert biztosít, mint a vancomycin terápia. A rezisztencia világszerte igen ritka, azonban a betegek alacsony toleranciája a szerrel szemben itt is problémát jelenthet.

Daptomycin: egy ciklikus lipopeptid, mely csak a Gram-pozitív kórokozók ellen hatásos. Hatását a bakteriális sejtmembrán károsítása útján éri el, és gyors bactericid hatása van, mint *in vitro*, mint *in vivo*. Alkalmazását elsősorban bőr és légyszövet fertőzéseknél ajánlják, ahol a linezolidhoz hasonló terápiás sikereket értek el.

Tigecyclin: új glycylcyclin antibiotikum (minocyclin származék). Rendkívül jó hatékonyságú nemcsak a Gram-pozitív, hanem Gram-negatív és anaerob kórokozók ellen is. Fázis II kísérletekben (bőr és légyszövet fertőzések, intra-abdominális infekciók) jó eredményeket értek el alkalmazásával. Nemcsak MRSA, hanem VISA/VRSA és VRE törzsek ellen is hatásos. Azonban hasonlóan a tetracyclinekhez, nem ajánlott várandós nők és kisgyermek (8 éves korig) kezelésében.

Meg kell említeni, hogy a fenti antibiotikumok alkalmazhatósága behatárolt: általában szűk spektrumúak (kivéve tigecyclin); inkább bakteriosztatikus, mint baktericid hatásúak; a hosszú kezelésnél előfordul alacsony tolerancia.

Az engedélyezés közelében, vagy azon túl lévő antibiotikumok mellett, van néhány, mely *in vitro* igen hatékony MRSA törzsekkel szemben. Jelenleg tart a fázisII/fázisIII kipróbálásuk, és várhatóan a közeljövőben a piacra kerülnek.

Telavancin: lipoglikopeptid, mely *in vitro* igen hatékony Gram-pozitív kórokozók ellen (MRSA, VRSA és VRE törzsek ellen is). Fázis II kipróbálás során bőr és légyszövet infekciók esetében szignifikánsan jobb terápiás hatásfoka volt, mint a hagyományos kezeléseknél.

Új glikopeptidek: Oritavancin vancomycinből, **dalbavancin** teicoplaninből fejlesztve. Mind az oritavancin, mind a dalbavancin klinikailag szignifikánsan jobb a hatékonyságú, mint a korábbi glikopeptidek. A dalbavancin szérumban mért rendkívül hosszú felezési idejével is kitűnik a hasonló szerek közül.

Ceftobiprol (Ro 63-9141, BAL9141): egy új osztályba tartozó (pyrrolidinon), parenterális cefalosporin. Nagy affinitással kötődik a penicillin-kötő fehérjékhez (pl. PBP2, PBP2a, PBP2x és PBP1a), így számos Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozóval szemben hatásos. A PBP2a 50%-os gátlási koncentrációja 0,87 μM , szemben a ceftriaxon 115 μM , vagy a methicillin >500 μM koncentrációjával. Bár az 1980-as évektől volt néhány ígéretes béta-laktám származék (pl. BRL-44154 penicillin-származék, amely állatkísérletekben jól működött, de emberben gyorsan lebomlott; vagy a L-695 256-os számú karbapenem, mely szintén kecsegtető eredményeket mutatott, de folyadék fázisban gyorsan kristályosodott, és nem kerülhetett forgalomba), a ceftobiprol hosszú ideje az egyetlen, mely már a fázis III kipróbálásánál jár, és valószínűleg a közeljövőben engedélyezni fogják használatát. Néhány fontosabb Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozó BAL9141-vel szembeni *in vitro*

érzékenységi eredményei az 1. táblázatban láthatók (P. Hebeisen et al. munkája alapján). Az adatok alapján jól hat MSSA, MRSA törzsek mellett *Streptococcus pneumoniae*-ra, *E. faecalis*-ra, a legtöbb *Enterobacteraceae* törzsrre, de nem (vagy alig) hat *E. faecium*-ra, *Proteus vulgaris*-ra, valamint az ESBL-termelő törzsekre.

Bakteriumtörzs (n)	Ceftobiprole MIC (mg/L)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC intervallum
MSSA (19)	0,5	1	0,25-1
MRSA (77)	2	4	0,5-4
Penicillin rezisztens <i>S. pneumoniae</i> (20)	0,5	2	0,5-4
<i>E. faecalis</i> (14)	0,5	4	0,25->32
<i>E. faecium</i> , Ampicillin MIC ≤8 mg/L (16)	4	8	1-8
<i>E. faecium</i> , Ampicillin MIC ≥16 mg/L (20)	>32	>32	8->32
ESBL-termelő <i>E. coli</i> (17)	4	>32	0,06->32
ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> (22)	4	>32	0,06->32
<i>Acinetobacter sp.</i> (42)	8	>8	<0,03->8
<i>P. aeruginosa</i> , Ceftazidim érzékeny (60)	2	16	1-16
<i>P. aeruginosa</i> , Ceftazidim rezisztens (17)	16	>64	2->64

1. táblázat

Egyes klinikailag jelentős baktériumtörzs in vitro érzékenysége ceftobiprollal szemben (P. Hebeisen et al.)

Az irodalom alapján -a korábban bemutatott már engedélyezett, és engedélyezés előtt álló antibiotikumokkal szemben - a ceftobiprol előnyös tulajdonságai: i, széles spektrumú szer, így az empirikus terápiában is jól alkalmazható lesz; ii, bactericid hatású, és az ilyen szerek bizonyos infekcióknál előnyt jelentenek a bakteriosztatikus szerekkel szemben (pl. endocarditis, meningitis, neutropéniás betegek infekciói, valamint kórházi súlyos infekciók esetében); iii, több független kísérlet is igazolta, hogy jóval lassabban alakul ki mutációs rezisztencia a törzsekben, mint pl. linezoliddal, quinupristin-dalfopristinnel, vancomycinnel vagy moxifloxacinnal szemben.

Az in vitro és in vivo vizsgálatok alapján az előzetes breakpoint 4 mg/L-nek adódott a *Staphylococcus aureus* törzseknél. In vivo állatkísérletekben (egér subcutan abscessusa, patkány endocarditis, patkány aorta eredetű bacteraemia, nyúl aortabillentyű endocarditis) szignifikánsan jobb eredményt adott, mint a vancomycinnel kezelt egyedeknél, és igen jó in vivo aktivitást mutatott a ≤2 mg/L MIC értékű MSSA, MRSA és A-csoportú streptococcusokkal szemben.

A klinikai alkalmazás során a ceftobiprol prodrug formáját, a ceftobiprol-medocaril-t használják, mely a szervezetben alakul át hatékony antibiotikumá. FázisII vizsgálatokat

végeztek komplikált bőr és lágyyszövet infekciók során, melyek biztató eredménnyel zárultak. A fázisIII kipróbálások jelenleg is folynak.

Tóth Ákos, dr. Gacs Mária
Irodalom:

Appelbaum PC: MRSA-the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Inf.* 2006, Vol 12, Suppl 2: 3-10

Bogdanovich T et al.: Antistaphylococcal activity of ceftobiprole, a new broad-spectrum cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49: 4210–4219

Chambers HF: Ceftobiprole: in-profile of a bactericidal cephalosporin. *Clin Microbiol Inf.* 2006, Vol 12, Suppl 2: 17-22

Greer ND: Tigecycline (Tygacil): the first in the glycycline class of antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2006, 19(2): 155–161

Hebeisen P et al.: In vitro and in vivo properties of Ro 63-9141, a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45: 825–836

Livermore DM: Can β -lactams be re-engineered to beat MRSA? *Clin Microbiol Inf.* 2006, Vol 12, Suppl 2: 11-16

Rubinstein E et al.: Worldwide assessment of linezolid's clinical safety and tolerability: comparator-controlled phase III studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003, 47: 1824–1831

Schaad HJ et al.: Evaluation of high-dose daptomycin for therapy of experimental *Staphylococcus aureus* foreign body infection *BMC Infect Dis.* 2006, 6: 74

Schmidt-Ioana M et al.: New antibiotics for the treatment of severe staphylococcal infection in the critically ill patient. *Curr Opin Crit Care.* 2005, 11: 481-486

Vaudaux P et al.: Intensive therapy with ceftobiprole medocaril of experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49: 3789-3793

Zbinden R et al.: In vitro activities of BAL9141, a novel broad-spectrum pyrrolidinone cephalosporin, against Gram-negative nonfermenters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002, 46: 871-874