

2009. IX. évfolyam 3. szám

**Tartalom:**

**Minőségbiztosítás a mikrobiológiai laboratóriumokban: kontroll törzsek fenntartása és kezelése**

Szabó Zsuzsa

**A kiterjedt-spektrumú béta-laktamáz termelés detektálásának lehetőségei**

Szakony Szilvia

**KPC-2 karbapenemáz termelő *Klebsiella pneumoniae* ST258 klón megjelenése Magyarországon**

Tóth Ákos, Damjanova Ivelina, Puskás Erzsébet, Jánvári Laura, Farkas Mária, Dobák András, Böröcz Karolina, Pászti Judit

**Az OEK Bakteriológia I. osztályára beküldött *Streptococcus pneumoniae* törzsek szerotípus meghatározásának aktuális adatai**

Tirczka Tamás

Helyesbítő kiegészítés: antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz szükséges kontroll törzsek táblázata

A Mikrobiológiai Körlevél ezen számának megjelenését a  
**Wyeth Kft.** támogatta.



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

**A Mikrobiológiai Körlevelek az OEK honlapján  
[www.oek.hu](http://www.oek.hu) elérhetőek.**

## Minőségbiztosítás a mikrobiológiai laboratóriumokban: kontroll törzsek fenntartása és kezelése

Szabó Zsuzsa

Ma már az élet szinte minden területén minőségi versenyt tapasztalunk, mind az állami, mind a privát szférában. Így alapvetővé vált a különböző mikrobiológiai paramétereket meghatározó bakteriológiai laboratóriumok minőségbiztosítása, legyenek bár az élelmiszeripar vagy vízvizsgálatokat végző, a környezetvédelem, a klinikai mikrobiológia, a gyógyszeripar, stb. területén tevékenykedő laboratóriumok. A cél, hogy biztosítsuk a különböző laboratóriumokban kapott adatok összehasonlíthatóságát, az alkalmazott vizsgálatok nyomon követhetőségét, a „nem megfelelések” megszüntetését, stb. A magas színvonalú munka végzését a jól működő belső minőségbiztosítási rendszer teszi lehetővé, amit bizonyos tárgyi feltételek is biztosítanak és ezek között fontos követelmény, hogy referencia kontroll törzsek álljanak rendelkezésünkre.

A teljesség igénye nélkül, kontroll (általában pozitív és negatív) törzsek szükségesek táptalajok ellenőrzéséhez, sterilitás vizsgálatához, festési eljárások kivitelezéséhez, biokémiai tesztek elvégzéséhez, kereskedelmi „kitek” ellenőrzéséhez, kórokozók antibiotikumokkal szemben mutatott érzékenységének és rezisztencia mechanizmusának vizsgálatához, MIC értékek meghatározásához, segédeszközök (pl. filter) ellenőrzéséhez. A megfelelő referencia kontroll törzsek kiválasztása fontos eleme a minőségbiztosításnak. Ehhez jó segítséget nyújthatnak a különböző kézikönyvek vagy az, hogy a törzsgyűjtemények honlapján általában megtalálható a különböző szempontok alapján csoportosított minőségellenőrző, „quality control” (QC) törzsek listája. A portáptalajokat, a laboratóriumi munkához szükséges különböző anyagokat forgalmazó cégek katalógusai, megfelelési igazolásai az ellenőrzésekhez szükséges kontroll törzseket is tartalmazzák. A „kitekhez” mellékelt útmutatók a minőségellenőrzés részleteit, így az ehhez szükséges QC törzseket is megadják.

A kiválasztott törzseket a Nemzeti Akkreditáló Testület által elfogadott nemzeti vagy nemzetközi gyűjteményekből szerezhethetjük be. A referencia anyagként felhasznált törzsszel kapcsolatban alapvető, hogy

- legyen ismert eredetű és genus vagy faji szinten azonosított mikroorganizmus,
- rendelkezzen olyan minőségi bizonylattal, amely a fentieket, továbbá
- a tartósított készítmény gyártási számát, lejáratát is tartalmazza.

Előfordulhat, hogy pl. egyes veszélyes kórokozók vagy újabb klinikai módszerek esetén, referencia törzsek nem állnak rendelkezésre a különböző törzsgyűjteményekben. Ilyen esetekben referencia kontroll törzsként egy megfelelő sajátosságokkal rendelkező tenyészet, pl. klinikai izolátum is alkalmazható. Ennek a jellemzőit ismételt, korszerű vizsgálatokkal (pl. a

rezisztencia mechanizmus molekuláris módszerekkel való igazolása), alkalmasint más, (referencia) laboratóriumokkal is elvégeztetve kell ellenőrizni (1).

Hivatkozva a mikrobiológiai laboratóriumok akkreditálásával kapcsolatos alapelveket tartalmazó EA-04/10 jelzésű dokumentumra (2), le kell szögezni, hogy a kontroll törzsek fenntartását a többi tevékenységtől (pl. minták fogadása és tárolása, feldolgozása, táptalajok készítése és eszközök előkészítése, sterilizálása, stb.) elkülönítve kell végrehajtani.

A törzsek hosszabb vagy rövidebb távra szóló fenntartása összetett folyamat. Egyrészt az adott szervezet igényeinek megfelelő tenyésztési és tartósítási eljárásokat, másrészt az így létrehozott tenyészetek ill. készítmények optimális körülmények közötti tárolását jelenti. Ugyanakkor magában foglalja a különböző módon történt eljárások és a tartósított tenyészetek ellenőrzésének napra kész, pontos dokumentációját is.

Bár a mikroorganizmusok fenntartásával kapcsolatos fogalmak számos közleményben megtalálhatóak (pl. 3, 4), érdemes ezeket jelen közleményben is megadni.

A **törzs** az izolálás (illetve reizolálás) alkalmával egyetlen telepéből származó, pontos szám- és/vagy betűjelzéssel azonosítható sejtpopuláció.

A **referencia kontroll törzs** (quality control strain) genus vagy faji szinten azonosított mikroorganizmus, amely nemzeti vagy nemzetközi gyűjteményekből származik, ahol eredete, azonosítója, jellemző tulajdonságai katalógusban szerepelnek, továbbá tulajdonságai elég homogének és stabilak ahhoz, hogy – szakszerű kezelés esetén – jól használható legyen eredmények verifikálásához, módszerek validálásához, kitek, tesztáptalajok stb. minőségellenőrzéséhez.

A referencia törzs **hitelesítése** (authentication) az adott törzs faji azonosító illetve egyéb speciális jellemzőinek összehasonlító vizsgálata, vagyis a törzs azonosságának megerősítése. A referencia törzsből kevés számú átoltással erednek a leszármazott állományok, amelyeket minden átoltás alkalmával ismételt hitelesíteni kell (reauthentication).

A **tenyészet** az adott időben és adott helyen, a laboratóriumi körülmények között létező sejtpopuláció, a törzs konkrét megjelenési formája.

Az **átoltás** egy életképes tenyészet sejtjeinek átvitele, „passzálása” friss tápközegbe vagy táptalajra. Egy fagyasztott készítmény felolvasztása vagy egy liofilizátum bontása után történő rehidráció még nem tekinthető passzálásnak. A megengedettnél többször ismételt átoltások a referencia kontroll törzsek minőségére ártalmas hatást fejthetnek ki; minden passzázs potenciális lehetőséget teremt a fertőzésre, genetikai változásra, amelynek révén a biokémiai markerek, az antibiotikum érzékenység ill. rezisztencia profil változhat és ennek veszélye annál nagyobb, minél „messzebb” jutunk az átoltások száma révén az eredeti tenyésztettől.

**Leszármazott tételek rendszere** (seed lot system): egy referencia törzs valamely törzsgyűjteményből származó tenyészetének tartósított készítményéből

nyert tenyészetekből hozzuk létre a szétosztható leszármazott referencia állományt, majd ennek újabb átoltása után jönnek létre a leszármazott referencia tenyészetek és munkatenyészetek. Alapvető, hogy végül a vizsgálatokhoz használt tenyészetek létrehozásáig az eredeti tenyészetből, majd az azt követő generációkból történő megengedett átoltások száma nem lehet több 5-nél.

A **referencia törzs** (master culture) **állománya** az elkülönített, referencia törzsekből származó elsődleges szubkultúrákból (liofilizált, mélyhűtött készítmények) áll.

A **leszármazott referencia állományt** (seed stock) optimális körülmények között tárolt, kiosztható, tartósított készítmények (liofilizált, mélyhűtött tenyészetek, stb.) alkotják.

A **leszármazott referencia tenyészet** (stock culture) a leszármazott állományból eredő elsődleges szubkultúra (2. átoltás).

A **munkatenyészet** (working culture) a leszármazott referencia tenyészetből eredő, friss táptalajon növekedő sejtek populációja, melyet az egyes vizsgálatok tesztorganizmusaként használunk. A vizsgálati protokoll során alkalmazott tenyészet **a referencia törzsállományból kevesebb, mint 5 átoltással hozható csak létre.**

A kontroll törzsek tenyészeinek **hosszú távú tartósítására** (long-term maintenance) alkalmazott módszerek:

- Fagyasztás (cryopreservation)
  - Mechanikai hűtéssel
  - Folyékony nitrogén alkalmazásával
- Liofilizálás (freeze-drying), vagyis fagyasztva szárítás

### **A fagyasztással történő tartósítás alapelvei**

Ha az élő sejteket optimális körülmények között lefagyasztjuk és megfelelően alacsony hőmérsékleten tároljuk, a sejtekben lévő víz megfagy, az anyagcsere leáll. Mivel a generáció szám nem változik, az átoltásokkal járó hátrányok kiküszöbölhetők.

A mélyhűtéssel, továbbá a liofilizálással tartósított tenyészetek szuszpenzióját olyan, vízben jól oldódó ún. **krioprotektív anyagokkal** egészítjük ki, melyek az alkalmazott eljárás alkalmával védőhatást biztosítanak a fagyasztáskor és felengedéskor az élő szervezetek számára. Legelterjedtebb a glicerin és a dimetil-szulfoxid (DMSO), melyek a sejtekbe jutva fejtik ki védő hatásukat, de a komplex, extracelluláris védőanyagok (pl. szérum, vérproteinek) is előnnyel alkalmazhatóak. Hatásuk azon alapul, hogy több fázisú rendszerekben csökkentik az eutektikus hőmérsékletet (azt az értéket, ahol az oldott anyag is megszilárdul), emellett gátolják a jégkristályok kialakulását. A túlélésben a sejtmembrán lipid-összetétele a döntő, korrelációban az alkalmazott krioprotektív anyagokkal. Minél inkább permeábilisek a sejtek, annál inkább képesek tolerálni a hűtést.

### A krioprotektív anyagok

- a sejtekbe penetrálnak és késleltetik az intracelluláris fagyást,
- csökkentik a fagyáspontot,
- a sejteket dehidrációra serkentik.

A glicerinnel kevésbé toxikus, mint a DMSO, de az utóbbi jobban penetrálódik, éppen ezért a nagyobb, komplexebb sejteknél (pl. egysejtűek, sejtkultúrák) hatékonyabb.

### Alkalmazásuk előtt:

- A glicerint autoklávozással sterilizzük, 15 percig, 121 °C fokon, 1.5 atm nyomáson (Fénytől védve, egy évnél tovább ne tároljuk, mert oxidatív melléktermékek keletkezhetnek.)
- A DMSO-t szűrővel sterilizzük
- Tárolásuk 1-1 adagonkénti kiszerezésben történjen. (Ezzel az esetleges fertőzési veszélyt minimalizáljuk, ill. megelőzzük, hogy a többszöri nyitogatás – az esetleges nedvesség felvétele miatt – csökkentse az adott anyag hatását.)

A törzseknek a fagyasztáshoz való előkészítése alkalmával lényeges az optimális körülmények biztosítása a **tenyésztéshez**, vagyis

1. A megfelelő táptalaj(ok) kiválasztása, amely(ek) lehetnek
  - szilárd vagy
  - folyékony tápközeg, esetleg
  - „bifázikus” növekedési körülmények (pl. a tenyészetet az ajánlott levesbe oltjuk, majd a levesből 0.3-0.5 ml-t a ferde agar felszínére rétegezzük, vagy lemezek esetén kb. 5-5 ml-t használunk a felülrétegezésre).
2. A megfelelő atmoszféra biztosítása  
(Aerált körülmények között növesztett baktériumok jobban tolerálják a fagyasztással járó stressz hatását, mivel nagyobb lesz a sejtek permeabilitása és az aerált sejtek gyorsabban dehidratálódnak a hűtésnél is.)
3. Az optimális inkubálási hőmérséklet alkalmazása
4. Az ideális hosszúságú inkubációs idő  
(A fagyasztáshoz a késői log és a korai stacioner fázisban lévő tenyészetek a legalkalmasabbak, mert nagyobb rezisztenciát mutatnak, mint a fiatalabb vagy öregebb sejtek.)

A tenyésztés után a sejteket egy olyan friss folyékony tápközegbe juttatjuk, amely már megfelelő végkoncentrációban (~10%) tartalmazza az előzőleg előkészített krioprotektív anyagot. A szuszpenzióknak kb.  $10^9$  CFU/ml ( $\geq 5$  McFarland) vagy annál nagyobb sűrűségűnek kell lennie. Ha a sejtek szilárd táptalaj felszínéről származnak, fontos, hogy táptalaj részecskék ne kerüljenek bele a szuszpenzióba. A folyékony táptalajban növesztett tenyészetet 1 óráig

centrifugáljuk kb. 4000 fordulatszám/perc alkalmazásával és az üledéket szuszpendáljuk a krioprotektív anyagot tartalmazó tápközegben.

Az ún. **kiegyensúlyozódás** (equilibration) periódusa az az időtartam, amely eltelik a sejteknek a friss táplevessel ill. a krioprotektív anyaggal való összekeverése és a hűtési folyamat megkezdése között. Általában minimum 15 perc és nem lehet több 45-60 percnél (utóbbi esetén a krioprotektív anyag már toxikus hatást fejthet ki). A szobahőmérsékleten végrehajtott expozíció azért szükséges, mert a krioprotektív anyagnak időt kell biztosítani a sejtekbe történő penetrációra. Ez egyébként a nagyobb és kevésbé permeabilis sejtek esetén hosszabb. Ideális esetben a végrehajtott manipuláció ideje elég hozzá.

A **hűtés sebessége** kritikus. Ha a hűtés túl lassú, a sejtek túlságosan gyorsan dehidratálódnak (először a sejten kívül képződik jég, mielőtt az intracelluláris jég kezd formálódni, a koncentráció különbség azonban a membránon keresztül kiegyenlítődik). Ha túl gyors, akkor a kívánatosnál nagyobb mennyiségű az intracelluláris jég. Minél inkább permeabilisek a sejtek, annál inkább képesek tolerálni a gyors hűtést. A legtöbb baktérium és spóráképző gomba jól viseli a kevésbé ideális hűtési rátát is, így elkészítésük és a kiegyensúlyozódás periódusának letelte után a preparátumokat közvetlenül  $-60-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lehet betenni, vagy ha ennél alacsonyabb hőmérsékleten kívánjuk tárolni, előtte alkalmazzunk 1 óra  $-60-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os expozíciót. Az érzékeny baktériumok és nem sporuláló gombák egyenletes, lassú hűtést igényelnek. A szabályozási lehetőségek között a nagyobb beruházást igénylő programozott hűtést vagy az egyszerűbb, ún. „Mr. Frosty” (5) berendezést említjük meg, de a kontroll nélkül alkalmazott szakaszos hűtés is célravezető lehet, amikor a preparátumokat 1-2 óráig, a lehetőségeinknek megfelelően, mind alacsonyabb hőmérsékleteken tartjuk.

Minél alacsonyabb a tárolási hőmérséklet, annál hosszabb idejű az életképesség megőrzésének ideje. Az érzékenyebb baktériumok hosszú távú fenntartására a  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$  alatti hőmérséklet a legmegfelelőbb, mert ilyen alacsony hőmérsékleten nincs anyagcsere aktivitás. Erre a célra legalkalmasabb a **flyékony nitrogén** ill. a tartályban lévő folyékony nitrogén **feletti gázfázis**. Az ATCC (American Type Culture Collection) adatai szerint az 1960 körül folyékony nitrogén alkalmazásával tartósított törzsek 99 %-a napjainkra is életben maradt. Különösen kiemelhető ez az eljárás a mutánsok és plazmidot hordozó szervezetek megővésére. Az előhűtésnél már célszerű a fagyasztócsöveket az alumínium kaniszterekbe rakni, továbbá a behelyezés előtt, az ún. másodlagos fagyasztás során, tartsuk pár percig a tartály nyaka közelében (kb.  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) és csak ezután helyezzük el végleges helyén, a folyékony nitrogén fölött (kb.  $-178\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on). Magában a tartály alján lévő folyékony nitrogénben a hőmérséklet  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de itt az esetleges keresztfertőzések miatt, a baktérium tenyészetek tárolása nem célszerű.

A folyékony nitrogén alkalmazásával kapcsolatban ki kell emelni az e helyütt nem részletezett balesetvédelmi szempontok fokozott figyelembe vételét,

továbbá a részletes dokumentáció szerepét, amelynek nemcsak a balesetvédelem szempontjából van nagy jelentősége, hanem az anyag felmelegedésének a veszélyét is minimalizálja.

### **Az életképesség visszaállításához szükséges felolvasztás szabályai**

A hűtéssel szemben a fagyasztott készítmény olvasztását gyorsan kell végrehajtani, ellenkező esetben a krioprotektív anyag vagy annak származékai toxikus hatást fejthetnek ki a sejtekre. A fagyasztott preparátumot tartalmazó fiolát 37 °C-os vízfürdőbe állítjuk, hogy tartalma teljesen felengedjen. Melegítés közben nem célszerű az anyagot erősen keverni. A felolvadt keveréket, a fiola fertőtlenítése után, közvetlenül a friss tápközegbe vagy tápközeg felszínére juttatjuk. Műanyag fiolák alkalmazása esetén a melegítés hosszabb időt igényel, viszont folyékony nitrogén alkalmazása esetén nem célszerű üvegampullákat használni (nem feltétlenül zárnak tökéletesen).

48 óra tárolás után már megkezdhetjük az **ellenőrző vizsgálatok** elvégzését. A tiszta tenyészet visszanyerése elsőrangú követelmény, de a mennyiségi és minőségi vizsgálatok elvégzése is döntő az ellenőrzés szempontjából. Módszertani problémákra utal például, ha ugyanazon gyártási számmal ellátott készítményekben a sejtszám nagyon különbözik.

Bár kevés laboratórium tartósítja a törzseket **liofilizálással**, a törzsek beszerzése leggyakrabban liofilizált formában történik. A készítmény a korszerű kiserelés eredményeképpen dupla csöves, a belső ampulla tartalmazza a fagyasztva szárított sejteket, a külső ampulla pedig magát a betétcsövet, az azonosításhoz szükséges jelzéseket és különböző megoldások alkalmazásával (szűrőpapír címke, korong vagy gélkristályokhoz rögzítetten) a levegő ill. a levegő nedvességtartalmának esetleges bejutását jelző indikátort. A liofilizálás első lépése, az elsődleges szárítás alkalmával a sejtek krioprotektív anyaggal kiegészített szuszpenzióját centrifugálás közben, evaporatív módon fagyasztjuk, ekkor vákuum alkalmazásával az összes szabad jég szublimál. A másodlagos szárításnál, vízelvonó anyag jelenlétében, a maradék nedvességet is igyekszünk eltávolítani. Ezután, még vákuum alatt, elvégezzük az ampullák lezárását. A liofilizátum sötétben, +10 °C körüli hőmérsékleten hosszú évtizedekig is eltartható és a fagyasztott készítménnyel szemben jól szállítható.

A **liofilizátum bontása** alkalmával az ampulla hegyes végét lángban hevítjük, majd az üveget egy csepp víz segítségével megrepesztjük. Legalább egy percig várjunk, hogy a repedésen keresztül a külső és a belső nyomás kiegyenlítődjön. Steril körülmények között a belső ampullát kicsúsztatjuk, majd a vattadugó eltávolítása után a Pasteur pipettával bemért folyékony tápközeggel a tenyészetet fellazítjuk (a porózus anyag könnyen szuszpendálható) és átvisszük a szervezet számára megfelelő tápközegbe vagy tápközeg felszínére. A liofilizátum bontásánál problémát okozhat



- az ampulla repesztése előtt az ampulla üvegfalának túlmelegedése, illetve
- az esetlegesen alacsony csíraszámhoz képest előkészített folyékony tápközeg nagy mennyisége.

Itt érdemes megemlíteni, hogy a tartósítás és a fagyasztva tárolás megoldható **üveggyöngyök** felszínére előzőleg felvitt tenyészet segítségével is. Ennek előnye, hogy egy preparátumot – a lejáratási időn belül – több alkalommal (a kereskedelemben kapható fiolákban általában 25 db gyöngy található) is felhasználhatunk. A kb.  $10^9$  CFU/ml sűrűségű szuszpenzióval beoltjuk a krioprotektív anyagot és a gyöngyöket már tartalmazó fiolát, majd az egyenletes eloszlás és a légbuborékok eltávolítása érdekében óvatosan elkeverjük és a gyöngyök feletti folyadékra maradóként maradéktalanul eltávolítjuk. Az ily módon elkészített preparátumokat tárolhatjuk folyékony nitrogénben ill. annak gázfázisában is. A kitenyésztés alkalmával mindössze 1 - 1 gyöngynek steril körülmények között történő kiemelése és megfelelő tápközegbe vagy tápközegre juttatása szükséges, ügyelve arra, hogy a készítmény közben ne engedjen fel.

### **Aktív anyagcserére képes tenyészetek létesítése**

Relatív hosszú ideig életképes tenyészeteket tudunk fenntartani:

- Dorset agaron (Dorset egg agar)
- Törzs agaron (Stock culture agar)

A Dorset agar felszínén kinőtt ill. a Törzs agarban, szűrt oltással létesített tenyészeteket szobahőmérsékleten tároljuk, eltarthatóság idejük – rendszertani hovatartozástól függően – 1-2 hónaptól 1-2 évig terjedhet (8). A Dorset és a Törzs agar használata már a múlt század 20-as éveitől ismert, de napjainkban is széles körben alkalmazzák.

A vizsgálatok céljaira az egyes törzsek igényeinek és típusainak megfelelően, rövidebb időközönkénti átoltásokkal létesítjük a munkatenyészeteket. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok esetén használandó kontroll törzsekre vonatkozóan lásd a CLSI aktuális kiadványaiban megadott időtartamokat.

A munkatenyészetek, a fagyasztott és liofilizált készítmények eltarthatósági idejére vonatkozóan, az alábbi táblázat adatai nyújtanak felvilágosítást:

Kategória	Tárolás +18 – 20 °C-on	Tárolás – 20 °C-on	Tárolás – 80 °C-on	Liofilizátum	Taxonok
Extrém sérülékeny	Percekig	0 év	< fél év	?	Pl. <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>Helicobacter felis</i>
Nagyon sérülékeny	Órák - max. 1 hét	< 3 hónap	< 1 év	3 év	Pl. <i>Cl. novyi</i> , <i>H. pylori</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Sérülékeny	Max. 2 hét	< fél év	< 2 év	10 év	Pl. <i>Bacteroides</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Legionella</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Normál	Max. 3 hét	< 1 év	< 3 év	30 év	Pl. <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Candida</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i>
Erős	Max. 4 hét	< 2 év	< 3 év	50 év	Pl. <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>

CCUG (Culture Collection, University of Göteborg), Sweden  
<http://www.ccug.se>

### Hibalehetőségek

Mivel az életképességet a táptalaj választás és az alkalmazott táptalaj minősége nagymértékben befolyásolja és az abszolút értelemben vett optimális feltételeket nem ismerjük egészen pontosan, az életképesség fogalma relatív. Amennyiben bármely tartósított készítmény visszanyerése kapcsán kételyek támadnának az adott törzs életképességével kapcsolatban, szükséges meghatározni a tenyészetek hígításával, az alkalmazott eljárás előtt és után is, adott egységnyi térfogatuk összes csíraszámát, természetesen ugyanazon táptalaj alkalmazásával. Ez annál is inkább szükséges lehet, mert a tartósítandó populációban bekövetkező esetleges szelektációs változást is a minimális sejtszám-csökkenést eredményező törzsfenntartási módszerrel lehet a lehető legkisebbre csökkenteni. Hibalehetőséget okozhat a nem megfelelő krioprotektív anyag kiválasztása és a fagyasztott készítmények szakszerűtlen tárolása. A nem körültekintően végzett munka miatt bekövetkező felmelegedés és az újra fagyasztás a tenyészet pusztulásához vezet.

Folyékony nitrogén alkalmazása esetén további hibalehetőséget teremthet, hogy a polipropilén fagyasztócsövek tömítőgyűrűjébe, és ezáltal magába a tartósított szuszpenzióba is behatolhat a folyékony nitrogén és ez fertőzést vagy keresztfertőzést okozhat. Ilyen a gázfázisban nem fordulhat elő, ott viszont az okozhat problémát, hogy a hőmérséklet nem állandó, hanem –135 és –190 °C között változik (értékei függnek a tartály alján fenntartott folyékony nitrogén szintjétől és a tartály nyitásának gyakoriságától). A vertikális hőmérsékleti gradiens ellenére, a fertőződés elkerülése érdekében az ATCC kifejezetten a gázfázisban történő tárolást ajánlja.

A preparátum készítésének a körülményei is számtalan hibalehetőséget eredményezhetnek, ezért célszerű egyszerre csak egy törzs előkészítését elvégezni a tartósításhoz.

A tartósítási eljárások **dokumentációja**, vagyis valamennyi adat szabatos rögzítése és megőrzése alapvető fontosságú a minőségbiztosítás szempontjából. Az írásos formában (előre elkészített formanyomtatványokon) vagy számítógépen tárolt file-ok segítségével nyilvántartott dokumentációnak részletesen tartalmaznia kell az alkalmazott módszerek leírását, a preparátum készítésének idejét, az átoltsók számát, a tárolt anyag helyét és azonosítóit, továbbá minden olyan információt, ami elősegíti kontroll törzseink alkalmazási lehetőségeinek ellenőrzését.

A fentiek csak egy vázlatos áttekintést nyújthattak a törzsek fenntartásával kapcsolatban, sok további fontos részletet csak az irodalom áttekintése alapján nyerhet az, aki a téma iránt érdeklődik vagy a minőségbiztosítás bevezetése illetve fenntartása miatt kényszerül annak alaposabb ismeretére.

Az elmúlt években az Országos Epidemiológiai Központban működő Törzsközpontban, vagyis az Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteményében (HNCMB), a közel öt évtizedes tapasztalatra támaszkodva, jelentős korszerűsítést hajtottunk végre (seed lot system alkalmazása, számos új törzs beszerzése, stb.). Ehhez a munkához kollégáim, Kurunczi Miklósné és Tóthné Móricz Cecilia, nagymértékben járultak hozzá. Amennyiben a jelen közlemény tárgyát képező témában bármely kérdés felmerülne, a Törzsközpont vezetőjeként - munkatársaimmal együtt - szívesen nyújtunk bármilyen segítséget. Az OEK honlapján (<http://www.oek.hu>) egyébként hozzáférhető egy széles körben alkalmazható kontroll referencia törzslista, amit folyamatosan frissítünk.

## Irodalom

1. AOAC International. Accreditation. Terms and Definitions. <http://www.aoac.org/accreditation/terms.htm>
2. EURACHEM/EA Guide 04/10. Accreditation for Microbiological Laboratories. [http://www.eurachem.org/guides/EurachemEA\\_Micro.pdf](http://www.eurachem.org/guides/EurachemEA_Micro.pdf)
3. Come Directly to the Source. Useful terms for ATCC Microbiology. ATCC Technical Bulletin no. 1 (2001) <http://www.atcc.org/Portals/1/Pdf/tb01.pdf>
4. Reference Strains: How many passages are too many? ATCC Technical Bulletin no. 6 (2006) <http://www.atcc.org/Portals/1/Pdf/tb06.pdf>
5. Simone FP (1998) Cryopreservation Manual <http://nalgene.com/nalgenunc.com/techdata/technical/cryo.pdf>
6. Kerrigan L (2007) Cryopreservation of Bacteria. PMF Newsletter 13(4) p.2 <http://www.microbiologyforum.org/PMFNews/PMFNews.13.02.0702.pdf>
7. Oetjen G-W, Haseley P: Freeze-Drying. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003
8. Klinikai és járványügyi bakteriológia. Kézikönyv. Czirók É. (főszerk) Melánia Kiadó, 1999

## A kiterjedt-spektrumú béta-laktamáz termelés detektálásának lehetőségei

Szakony Szilvia

(A bioMérieux Hungária Kft. felkérésére a 2009 május 6. Szakmai Napon elhangzott előadás írásban megjelenő változata.)

A széles spektrumú penicillinek 1960-as évekbeli felfedezését követően hamarosan megjelentek a rezisztens törzsek. A rezisztenciát többnyire béta-laktamázok okozták. Különböző béta-laktamáz típusokat ismertek fel és osztályoztak a hidrolitikus profil, cloxacillin és p-chloromercuri-benzoát gátlással szembeni érzékenység illetve az alapján, hogy az enzimet kódoló gén plazmidon vagy kromozómán helyezkedik el (1,2). A hidrolitikus profil alapján széles spektrumúaknak nevezték azokat a béta-laktamázokat, amelyek egyforma mértékben hidrolizálták a benzilpenicillint és a cefaloridint. A széles spektrumú enzimek között TEM-1, TEM-2 és SHV-1 típusúakat különböztettek meg. A TEM-1 volt a legelterjedtebb, a TEM-2 és az SHV típus tízed annyiszor ritkábban fordult elő, de így is a második és harmadik leggyakoribb típus maradt. A TEM típus eredete bizonytalan, nevét egy athéni beteg (TEMoneira) után kapta. Az SHV (SzulfHidril Variáns) a *Klebsiella pneumoniae* kromozómális béta-laktamázából származik.

A plazmid mediálta TEM és SHV enzimek terjedésének kivédésére fejlesztették ki az 1970-es évek közepén a béta-laktamáz stabil béta-laktámokat (oxyiminocefalosporinok, cefamycinek, aztreonam, karbapenemek). Az oxyiminocefalosporinok (cefuroxim, cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim, cefepim) széles körű használata erős szelekciós nyomást jelentett, aminek hatására az 1980-as években megjelentek olyan béta-laktamáz mutánsok, amelyek képesek voltak ezen antibiotikumok hidrolízisére is. 1989 óta hívjuk ezt az enzim csoportot kiterjedt-spektrumú béta-laktamázoknak (ESBL). 1995-ben Karen Bush a béta-laktamáz osztályozást átdolgozta és ekkor kerültek az ESBL-k a 2be osztályba (1. ábra).

Az *Enterobacteriaceae* család két fő stratégiát adoptált az ESBL termelés eléréséhez: 1. mutációkkal a széles-spektrumú TEM és SHV típusú béta-laktamázok szubsztrát specificitásának bővítése, 2. horizontális transzferrel olyan új gének befogása, amelyek ESBL aktivitással rendelkező enzimeket kódolnak. Ilyen a CTX-M típusú béta-laktamázokat kódoló gén (*bla*<sub>CTX-M</sub>), ami a *Kluyvera* genus kromozómális génjéből származik. A CTX név a cefotaximmal szembeni erős hidrolitikus aktivitásra utal. A *bla*<sub>CTX-M</sub> gén horizontális terjedése az *Enterobacteriaceae* családban plazmid útján történik és gyakran egyéb rezisztencia géneket is hordoz (3). Az utóbbi 15 évben a CTX-M típusú ESBL-ek körében gyors és globális terjedés tapasztalható. Korábban az ESBL termelő törzsek kórházi fertőzésekben fordultak elő, manapság egyre gyakrabban találkozunk velük közösségben szerzett infekciók kapcsán is. Jelenleg a „rég

ESBL-ek” (TEM, SHV) között több, mint 260 variánst, az „új ESBL-nél” (CTX-M) több, mint 65 típust és a „minor ESBL-k” (VEB, GES, PER, SFO-1, TLA-1, TLA-2, BES-1, BEL-1) esetében több, mint 20 félért írtak le (4).

A mai napig nincs konszenzus az ESBL-ek definíciója körül. Az általánosan elfogadott munka definíció szerint ide tartoznak azok a béta-laktamázok, amelyek penicillinekkal, 1., 2. és 3. generációs cefalosporinokkal és aztreonammal szemben rezisztenciát alakítanak ki és béta-laktamáz inhibitorokkal (például klavulánsavval) gátolhatóak (5).

Az 1990-es évek végéig Európában a legtöbb ESBL TEM és SHV típusú volt, a legtöbb izolátum intenzív osztályon kialakult nozokomiális járványból származott és az ESBL termelők prevalenciája magasabb volt a *K. pneumoniae*, mint az *E. coli* izolátumok között. A meghatározott rizikó faktorok közé intenzív osztályos felvétel, sebészeti beavatkozás, katéterek használata, hosszas kórházi tartózkodás és megelőző cefalosporin és/vagy aminoglikozid alkalmazása tartozott. Az utóbbi néhány évben ez a helyzet megváltozott. A legtöbb ESBL termelő izolátum *E. coli*, ami CTX-M típusú béta-laktamázt termel. Ezek a baktériumok közösségben szerzett, főleg húgyúti infekciókból származnak. A kórházakban már nem csak az intenzív, hanem egyéb osztályokról is növekvő számban detektálható ESBL törzs. Ezen kívül krónikus osztályokon és ápolási intézményekben is megfigyelhető a növekedés. Új rizikó tényező is megjelent: megelőző fluorokinolon használata (6).

A kórházon belüli ESBL termelő törzsek terjedésének megakadályozására az infekció kontrollnak a következő területeken vannak feladatai: 1. Az ESBL termelő baktériummal fertőzött betegek felkutatása a megfelelő klinikai mikrobiológia módszerek használatával. 2. A kolonizált betegek identifikálása rektális mintából, szelektív táptalajokon. 3. A fertőzött és kolonizált betegek törzseinek molekuláris epidemiológiai vizsgálata a klonalitás kiderítése érdekében. 4. Az érintett betegek izolálásának megszervezése, különösen, ha a klonalitás bizonyított. 5. Az antibiotikum használat kontrollálása, a szelekciós nyomás csökkentésére, különösen, ha több típusú törzs fordul elő. 6. Adekvát kézhigiénia és megfelelő személyzet/beteg arány biztosítása (5).

A klinikai mikrobiológiai gyakorlatban az ESBL termelés az adott baktérium törzs cefalosporinokkal szembeni érzékenysége alapján merül fel a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) által meghatározott határértékek alapján. Ezeket a határértékeket az *Enterobacteriaceae* család tekintetében az 1980-as években állapították meg, amikor a klinikai hatékonyság  $\leq 8$  mg/L MIC értéknél  $>95\%$ -os volt. Több tanulmány jelent meg arról, hogy ha ESBL termelő törzs okozta súlyos infekciót cefalosporinnal kezeltek, a klinikai sikertelenségi ráta 42-100% lett. Ezért mind a CLSI, mind a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) felülbíráta a 3. generációs cefalosporinok határértékeit. Európában ez az egyes nemzeti határértékek harmonizációját is jelentette. Az új határértékeket 2006-ban véglegesítették. A CLSI új határértékei még nem léptek hatályba. Mindkét

szervezetnél a fő kérdés, hogy az új klinikai határértékek meg tudják-e jósolni a klinikai sikert vagy kudarcot további kiegészítő tesztek nélkül, illetve a laboratóriumnak szükséges-e megerősítő vizsgálatokat végeznie ESBL jelenlétére vonatkozóan, mielőtt kiadnák az érzékenységi eredményt. Arra a következtetésre jutottak, hogy korrekt klinikai határértékekkel elkerülhető az ESBL szűrés szükségessége a klinikai kimenetel megítéléséhez. De epidemiológiai megfontolásból továbbra is elengedhetetlen a rezisztencia mechanizmus meghatározása. Az ESBL termelő *Enterobacteriaceae*-k növekvő incidenciája miatt (kórházban és közösségben egyaránt) fontos, hogy valamennyi törzset vizsgáljuk (7).

A CLSI ajánlása szerint először szűrővizsgálatot kell végezni a megadott antibiotikumokkal (1. táblázat). Egy vagy több antibiotikum használata javasolt, de ha egynél több antibiotikumot alkalmazunk, a szűrés érzékenysége növekszik. Ezek után, ha találunk olyan izolátumot, ami ESBL termelésre gyanús, a fenotípusos megerősítő tesztet ceftazidimet és cefotaximot önmagában és klavulánsavval kiegészítve készítsük. A CLSI ajánlás nagy hátránya, hogy nem ad útmutatást olyan *Enterobacteriaceae* családba tartozó speciestek esetében, mint *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *P. stuartii*, *Serratia* spp.

A EUCAST epidemiológiai cut-off értékei alternatív lehetőséget nyújtanak az ESBL termelő *Enterobacteriaceae*-k szűrésére. Az antibiotikum érzékenység meghatározást és az ESBL szűrést egyszerre végezhetjük a EUCAST új klinikai határértékei és epidemiológiai cut-off értékei használatával. Ehhez cefotaxim (vagy ceftriaxon) és ceftazidim MIC értékekre vagy gátlási zóna átmérőkre van szükségünk (2. táblázat). A határérték alapján a klinikai érzékenységi kategóriát adhatjuk meg, míg az epidemiológiai cut-off értékkel kizárhatjuk az ESBL (vagy egyéb rezisztencia mechanizmus) jelenlétét. Tehát ha egy izolátum MIC értéke az epidemiológiai cut-off felett van, rezisztencia mechanizmust kell feltételeznünk a vizsgált törzsnél, ami lehet ESBL is (7).

Céltott szűrést végezhetünk ESBL szűrő szelektív kromogén táptalajjal. Így az ESBL termelő törzssel kolonizált tünetmentes betegek felkutatása leegyszerűsödik és felgyorsul. A szelektivitást az antibiotikum keverék biztosítja, ami cefpodoximot is tartalmaz, növelve ezzel a táptalaj szenzitivitását. A két kromogén (béta-glukuronidáz, béta-glukozidáz) és egy természetes szubsztrát (deamináz) segít az *Enterobacteriaceae* családban leggyakrabban előforduló ESBL termelő törzsek direkt elkülönítésében, a vizeletminták tenyésztéséhez használt szelektív kromogén táptalajokhoz hasonlóan.

Amikor nem céltottan szűrünk ESBL termelő törzseket, akkor is célszerű olyan antibiotikum sort alkalmaznunk az *Enterobacteriaceae* család esetében, hogy minél nagyobb valószínűséggel tudjuk detektálni ezeket a baktériumokat. Az egyes cefalosporinok antibiotikum érzékenységét a különböző rezisztencia mechanizmusok esetén a 3. táblázat mutatja. A legnagyobb érzékenységet akkor érhetjük el, ha 3 cefalosporint használunk a mindennapi rutinban: ceftazidim,

cefotaxim (vagy ceftriaxon) és cefpodoxim. A cefpodoxim a legérzékenyebb indikátora a rezisztencia jelenlétének. Ceftazidimet önmagában a CTX-M típusú ESBL termelő baktériumok miatt nem érdemes használni, ugyanis a CTX-M típusú béta-laktamázok többsége a béta-laktám kötőhely sajátos geometriája miatt hatékonyan bontják a cefotaximot és a ceftriaxont, de a terjedelmesebb ceftazidimhez nem tud a kötőhely kapcsolódni.

A fenotípusos megerősítő tesztek között az első teszt, amit kimondottan az ESBL termelő *Enterobacteriaceae*-k detektálására találtak ki, az úgynevezett „double-disk synergy test” (DDST) volt. Az eredeti tesztet 30 $\mu$ g-os cefotaxim koronggal és amoxicillin-klavulánsav (10 $\mu$ g klavulánsav tartalmú) koronggal végezték. A két antibiotikum korongot 30 mm-re (közép-közép távolság) helyezték el egymástól. Ha a cefotaxim korong körül jellegzetes gátlási zónát kaptak, amit „pezsgősdugó” illetve „kulcslyuk” alakúnak írtak le, akkor a tesztet pozitívnak, a törzset pedig ESBL termelőnek minősítették. Megbízható módszernek tekinthető az ESBL detektálására, néha azonban szükség van a korongok közötti távolság megváltoztatására. Ha csökkentjük a távolságot a klavulánsavat tartalmazó és a 3. generációs cefalosporin korong között (pl. 20 mm-re), akkor szignifikánsan javul a teszt érzékenysége (8,9). Ha a klavulánsavat tartalmazó korongot a rutin antibiotikum sorban két 3. generációs cefalosporin (ajánlott cefotaxim vagy ceftriaxon és ceftazidim) közé tesszük, nem csak a beszűkült gátlási zóna, hanem a szinergizmus következtében a jellegzetes zóna alak is felhívhatja a figyelmünket az ESBL termelő törzs jelenlétére. Az ESBL E-tesztet a cefalosporinok és a klavulánsav közötti szinergia mennyiségi meghatározására fejlesztették ki. A CT/CTL, TZ/TZL és PM/PML nevű E tesztek két végű csíkok, amelyeknek az egyik végén cefotaxim (CT), ceftazidim (TZ) és cefepim (PM) grádiens, a másik végén ugyanazon antibiotikum grádiens és fix koncentrációjú (4 mg/L) klavulánsav kombinációja szerepel. Az ESBL teszt akkor pozitív, ha a vizsgált szer MIC értéke három hígítási lépéssel kisebb klavulánsav jelenlétében, mint anélkül, vagyis a MIC ráta  $\geq 8$ . De a teszt akkor is pozitívnak tekintendő, ha kerekded (u.n. fantom) zóna látható a CTL, TZL vagy PML grádiens legkisebb koncentrációja alatt vagy ha a CT, TZ vagy PM gátlási zónája deformált (nem szabályos ellipszis alakú) a kis koncentrációjú végén. A teszt eredménye nem értékelhető, ha a cefalosporinok MIC értéke magasabb, mint a csíkon lévő legnagyobb antibiotikum koncentráció. Az ESBL E-teszt eredményének interpretálása tehát elég nehéz és nagy gyakorlatot igényel. Egy tanulmány szerint a laboratóriumok körülbelül 30%-a rosszul ítélte meg az eredményt (10).

A CLSI ajánlásában is szereplő megerősítő teszt a kombinációs korong módszer. A vizsgálat során összehasonlítjuk az adott cefalosporin korong körüli gátlási zónát, az ugyanazon cefalosporin+klavulánsav tartalmú korong körüli zónával. Ha a két zóna között a különbség  $\geq 5$  mm vagy a gátlási zóna átmérő növekedése 50%-os a klavulánsav tartalmú korong javára, a teszt pozitív, vagyis ESBL termelőnek minősítjük a baktériumot. A teszt kivitelezése és

interpretálása egyszerű. Ennél a tesztnél írtak le először 96%-os szenzitivitást és 100%-os specificitást (11).

Az automatizált módszerek közül a VITEK 2 (bioMérieux) ESBL teszt 3 cefalosporin (cefotaxim, ceftazidim, cefepim) antibakteriális aktivitását vizsgálja önmagában és klavulánsavval kombinálva. Az ESBL kártya inokulációját követően a készülék rendszeres időközönként leméri a cellák turbiditását és a növekedés gátlás eredményeit összehasonlítja. A kapott értékek és eloszlás alapján a számítógépes program (Advanced Expert System) ESBL pozitívnak vagy negatívnak minősíti a vizsgált törzset. A Phoenix (Becton Dickinson) ESBL teszt is hasonló elven működik, csak itt öt cella (cefpodoxim, ceftazidim, ceftazidim + klavulánsav, cefotaxim + klavulánsav, ceftriaxon + klavulánsav) mérései és egy algoritmus alapján adja meg a számítógépes program az eredményt. Egy legutóbbi összehasonlító tanulmány szerint az ESBL detektálás szenzitivitása és specificitása a Phoenix esetében 96% és 81%, a VITEK 2 esetében 89% és 85% volt (12).

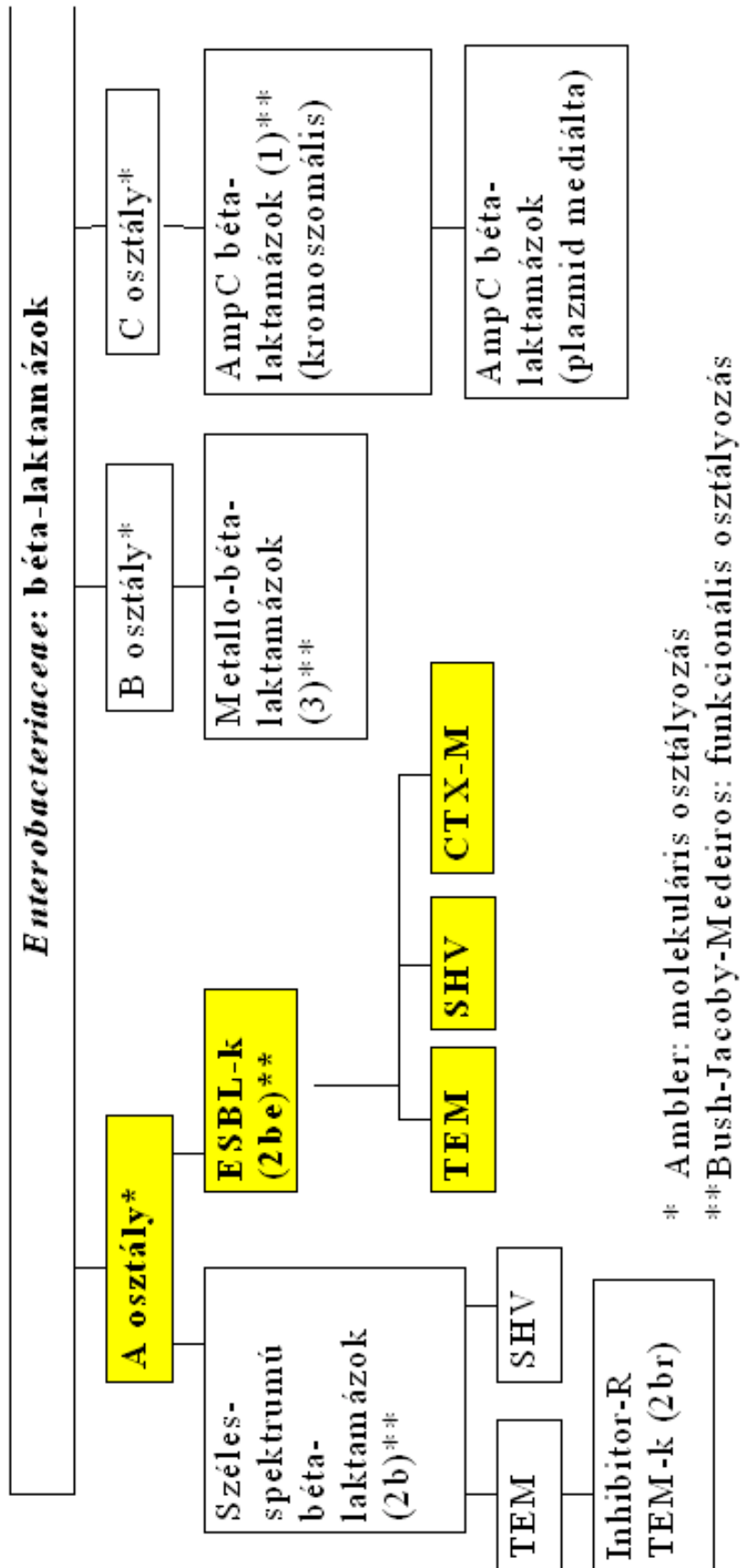
Számos baktérium species (*Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morgani*, *P. stuartii*, *S. marcescens*) rendelkezik indukálható kromoszómális AmpC béta-laktamázzal. Ezen enzimek mellett együttesen jelen lehet a szerzett ESBL termelés is. Ilyenkor az eddig felsorolt tesztek önmagukban nem vezetnek eredményre az ESBL termelés kimutatására. Ha az AmpC béta-laktamáz termelés indukálható, a szinergista hatás ugyanolyan könnyen detektálható, mintha az ESBL termelés önmagában lenne jelen. De ha az AmpC béta-laktamáz stabil túltermeléséről van szó, a szinergizmus nem látható. Ilyenkor módosított tesztekkel detektálhatjuk az ESBL termelést: 1. A cefepimet az AmpC cefalosporinázok kevésbé gyorsan inaktiválják, mint az ESBL-ek. Ha a DDST-ben cefepimet használunk és 20 mm-re helyezzük a klavulánsavat is tartalmazó korongtól, akkor a szenzitivitás 90%-ra növelhető. 2. Ha a DDST-t cloxacillint (200 mg/L) tartalmazó agaron végezzük, a cefalosporináz aktivitás gátlódik és az ESBL termelés detektálható lesz. 3. Ha a detektálási határon kívül eső MIC értékeket kapunk az ESBL E-tesztnél, ismételjük meg a vizsgálatot cloxacillin (200 mg/L) tartalmú agaron, ahol az ESBL termelés kimutathatóvá válik.

Az ESBL termelés felismerése és megerősítése fenotípusos módszerekkel sokszor egyszerű, néha nehéz vagy lehetetlen feladat elé állítja a klinikai mikrobiológiai laboratóriumokat. Egy tanulmány szerint az USA-ban a National Nosocomial Infections Surveillance hálózatában rendszeresen résztvevő 193 laboratóriumnak csak 51%-a detektálta helyesen ESBL termelőnek a kiküldött teszt törzset (13). Európában is hasonló arányokat találtak a külső minőségellenőrzési vizsgálatok során. Ezért arra kell törekednünk, hogy a methicillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) kimutatásához hasonló jó (közel 100%-os) eredményeket érjünk el az ESBL termelés detektálásában is.



## Irodalom

1. Richmond MH, Sykes RB. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; **9**:31-88.
2. Metthew M. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *J Antimicrob Chemother* 1979; **5**: 349-358
3. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1-14
4. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamases *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** (Suppl. 1): 42-52
5. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 657-686
6. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** (Suppl. 1): 144-153
7. Kahlmeter G. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae-EUCAST and CLSI breakpoints. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** (Suppl. 1): 169-174
8. Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional test. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 1877-1882
9. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** (Suppl. 1): 90-103
10. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Boks AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK1, and VITEK2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3703-3711
11. Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 1081-1085
12. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and Vitek 2 ESBL detection tests against *E. coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 2380-2384
13. Hageman JC, Fridkin SK, Mohammed JM, Steward CD, Gaynes RP, Tenover FC. Antimicrobial proficiency testing of National Nosocomial Infections Surveillance System hospital laboratories. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; **24**: 356-361



1. ábra Az *Enterobacteriaceae*-k által termelt béta-laktamázok

1. táblázat A CLSI ajánlása szerinti ESBL szűrő teszt gátlási zóna átmérői

Antibiotikum korong	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>
Cefpodoxim (10 µg)	≤ 17 mm	≤ 17 mm	≤ 17 mm	≤ 22 mm
Ceftazidim (30 µg)	≤ 22 mm	≤ 22 mm	≤ 22 mm	≤ 22 mm
Cefotaxim (30 µg)	≤ 27 mm	≤ 27 mm	≤ 27 mm	≤ 27 mm
Ceftriaxon (30 µg)	≤ 25 mm	≤ 25 mm	≤ 25 mm	-
Aztreonam (30 µg)	≤ 27 mm	≤ 27 mm	≤ 27 mm	-

 2. táblázat A *Enterobacteriaceae*-k klinikai MIC határértékei, valamint epidemiológiai cut-off értékei a EUCAST ajánlása szerint (lásd: <http://www.eucast.org>)

	Klinikai határérték	Epidemiológiai cut-off értékek Vad típus (VT)						
		<i>E. coli</i> VT ≤ (mg/L)	<i>K. pneumoniae</i> VT ≤ (mg/L)	<i>K. oxytoca</i> VT ≤ (mg/L)	<i>P. mirabilis</i> VT ≤ (mg/L)	<i>C. freundii</i> VT ≤ (mg/L)	<i>Enterobacter</i> spp. VT ≤ (mg/L)	<i>Salmonella</i> spp. VT ≤ (mg/L)
Cefuroxim	<b>8 / 8</b>	8	8	8	4	8	8-16	16
Cefotaxim	<b>1 / 2</b>	0,25	0,12	0,12	0,06	0,5	0,5	0,5
Ceftriaxon	<b>1 / 2</b>	0,25	0,12	0,12	0,06	n.a.	0,5	n.a.
Ceftazidim	<b>1 / 8</b>	0,5	0,5	0,5	0,12	1	1	2
Cefepim	<b>1 / 8</b>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	n.a.

 2. táblázat *Enterobacteriaceae*-k között előforduló különböző béta-laktamázok rezisztencia fenotípusa és szinergizmusa klavulánsavval

Béta-laktamázok	In vitro rezisztencia fenotípus								Szinergizmus klavulánsavval		
	CAZ	CTX	CRO	CXM	CPD	FOX	ATM	IPM	CAZ	CTX	CPD
ESBL (SHV, TEM)	<b>R</b>	v	v	V	<b>R</b>	E	V	E	+	+	+
AmpC túltermelés vagy plazmidon kódolt AmpC	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	E	-	-	-
OXY típusú béta-laktamáz túltermelés ( <i>K. oxytoca</i> )	E	v	v/R	<b>R</b>	<b>R</b>	E	<b>R</b>	E	-	-/+	-
ESBL (CTX-M)	v	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	E	v	E	+/-	+	+

E: érzékeny, v: változó az enzim mennyiségétől és típusától függően, R: rezisztens  
 CAZ: ceftazidim, CTX: cefotaxim, CRO: ceftriaxon, CXM: cefuroxim, CPD: cefpodoxim, FOX: cefoxitin, ATM: aztreonam, IPM: imipenem

## KPC-2 karbapenemáz termelő *Klebsiella pneumoniae* ST258 klón megjelenése Magyarországon

Tóth Ákos, Damjanova Ivelina, Puskás Erzsébet, Jánvári Laura, Farkas Mária, Dobák András, Böröcz Karolina, Pászti Judit

### Abstract

Nine *K. pneumoniae* isolates showing non-susceptibility to carbapenems were collected from 3 centres in the Northeastern Region of Hungary. The MICs of antibiotics were determined by Etest. The putative production of a carbapenemase was tested by the modified Hodge-test. The presence of *bla*<sub>KPC</sub> genes was verified by PCR and sequencing. Furthermore, molecular typing was performed by PFGE and multilocus sequence typing comparing to the closely related ST11 Hungarian isolates.

All isolates showed extensively drug-resistant (XDR) phenotype, of these eight isolates were highly resistant to colistin. The isolates carried *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>SHV-11</sub>. PFGE analysis of 33 ST11 *K. pneumoniae* isolates, nine KPC-producing Hungarian and two KPC-2-producing Norwegian isolates revealed the existence of one genetic cluster at 88% similarity level. Within the cluster all ST11 isolates comprised one subcluster as well as all ST258 isolates were grouped into another one.

According to the results the first Hungarian KPC-producing isolate was probably imported from Greece, while local transmission of other isolates was supposed. The overall results of the PFGE clustering, MLST and the presence of SHV-11 in both ST11 and ST258 suggest that this is the first hyperepidemic clonal complex of multidrug resistant *K. pneumoniae*, probably CC11, candidating for pandemic spread.

### Bevezetés

A KPC-típusú (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) béta-laktamázok gyakorlatilag az összes béta-laktám antibiotikumot képesek hidrolizálni, beleértve a karbapenemeket is (1). Ezt első alkalommal az USA-ban írták le 1996-ban *K. pneumoniae*-ban (2). Azóta is túlnyomórészt ebben a fajban találták meg, azonban mára már számos más *Enterobacteriaceae* speciesben és *Pseudomonas aeruginosa*-ban is kimutatták. Az utóbbi egy évtizedben a KPC-termelők aránya rohamosan nőtt a *K. pneumoniae* törzsek között, sőt ezek klonális megjelenését is leírták. Az egyik legelterjedtebb az ST258 szekvencia típusba tartozó KPC-termelő *K. pneumoniae* klón, melyet eddig Izraelben, USA-ban (3), Norvégiában, Svédországban (4) és Lengyelországban (5) írtak le. Ezek a törzsek a β-laktámok mellett több más antibiotikum csoporttal szemben is rezisztenciát mutatnak, amelyeket már nem MDR (multidrug resistant), hanem

XDR (extensively drug resistant) fenotípusúnak neveznek. Souli és mtsai megfogalmazása szerint az XDR fenotípus – a *Mycobacterium tuberculosis* esetében használt kifejezéshez hasonlóan – olyan rezisztenciakép, amikor a baktériumtörzs egy vagy két antibiotikum osztály kivételével minden más egyébként hatékony antibiotikummal szemben rezisztenciát mutat (6).

Jelen írásukban a szerzők beszámolnak az első KPC-termelő *K. pneumoniae* törzsek magyarországi megjelenéséről, és ezek molekuláris epidemiológiájáról összehasonlítva a közeli rokon ST11 izolátumokkal, melyeket korábban Magyar Epidémiás Klón III-ként írtak le (7).

### Anyagok és módszerek

2008. október és 2009. április között kilenc, karbapenemekkel szemben nem-érzékeny *K. pneumoniae* izolátumot küldtek be az Országos Epidemiológiai Központba a rezisztencia mechanizmus meghatározására és molekuláris tipizálásra. A kilenc törzs hét betegtől származott a következő megoszlásban: seb (n=2), alsólégúti váladék (n=2), felső légúti váladék (n=2), széklet (n=2) és centrális véna kanül (n=1).

A törzsek identifikálása Micronaut E rendszerrel történt (Genzyme Virotech GmbH, Russelheim, Németország). A törzsek antibiotikumokkal szembeni MIC értékét Etest-tel határozták meg (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Franciaország) a gyártó útmutatása szerint. Az eredmények interpretálása az European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints)) határértékei alapján történt.

A felételezett karbapenemáz termelés fenotípusos kimutatását módosított Hodge-teszt, valamint kombinált korong módszer segítségével végezték (meropenem, ertapenem és imipenem korong magában és különböző karbapenemáz inhibitorokkal kiegészítve: 835 µg ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 835 µg dipikolin sav valamint 400 µg 3-amino-phenil-boronic acid) (8).

A *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> (6) és a *bla*<sub>KPC</sub> béta-laktamáz gének (9) kimutatása PCR módszerrel, a béta-laktamáz variánsok meghatározása a PCR termékek szekvenálásával történt.

A CDC protokollja alapján végzett pulzálatott mezejű gélelektroforézissel (PFGE) hasonlították össze a hazai ST11 *K. pneumoniae* (n=33), a kilenc hazai és két norvég (K47-25 és K48-48 (4)) KPC-2-termelő *K. pneumoniae* törzs genetikai hátterét.

A PFGE vizsgálat alapján kiválasztott izolátumokon multilokusz szekvencia analízist végeztek (MLST) (10), melynek során hét ún. háztartási gén szekvencia analízisét végzik. Az allél szekvenciákat és a szekvencia típusokat (ST) a <http://www.pasteur.fr/mlst> honlapon található adatbázis alapján határozták meg.

## Eredmények és megbeszélés

Az első KPC- termelő izolátumot (K509/08) egy magyar beteg mintájából izolálták, akit egy görögországi kórházból a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórházba szállítottak át 2008. októberében. Az első beteget kezdetben az idegsebészeti osztályon, majd az intenzív terápiás osztályon ápolták. A K120/09 és K168/09 izolátumokat 2009. elején tenyésztették ki egy olyan beteg mintáiból, akit az intenzív terápiás osztályon egy időben ápoltak az első beteggel. A K105/09 és K153/09 izolátumokat a harmadik, míg a K160/09 izolátumot a negyedik beteg mintájából tenyésztették ki. Ezt a két beteget azon az idegsebészeti osztályon is ápolták, ahol az első beteget, azonban egy hónappal később. A negyedik beteget később átszállították a MISEK diósgyőri telephelyére, ahol három különböző osztályon is ápolták. A negyedik és az ötödik beteget, akinek a mintájából a K167/09 izolátum kitenyésztett, a MISEK Diósgyőr intenzív terápiás osztályán ápolták egyidejűleg. A K97/09 és K132/09 KPC-termelő *K. pneumoniae* izolátumokat két olyan beteg mintájából tenyésztették ki, akiknek a kórházi tartózkodása alatt nem volt ismert kapcsolata a korábbi öt beteggel. Mindegyik beteg elhunyt a kórházi kezelés során, a boncolás eredménye alapján két eset volt összefüggésbe hozható a KPC-termelő *K. pneumoniae* okozta fertőzéssel.

Mind a kilenc izolátum XDR (extensively drug-resistant) fenotípust mutatott. Magas fokú rezisztenciát mutattak a széles spektrumú cefalosporinokkal és ciprofloxacinnal szemben, rezisztensek voltak ertapenemmel, imipenemmel és amikacinnal szemben. Meropenem esetében változó MIC értékekkel rendelkeztek az izolátumok (MIC 8->32 mg/L). Nyolc törzs tigeicyclinre mérsékelten érzékeny, míg egy (K105/09) rezisztens (MIC 4 mg/L) volt. Minden izolátum esetében a gentamicin MIC értékét is emelkedettnek találták. Ezek az MIC értékek nagyon hasonlóak voltak a norvég és svéd KPC-termelő *K. pneumoniae* törzsekéhez (4).

Fontos megemlíteni, míg az első izolátum (K509/08) magas szinten rezisztens volt trimethoprim-sulfamethoxazollal szemben (MIC >32 mg/L) és colistinre érzékeny (MIC 0,5 mg/L), addig a további nyolc izolátum trimethoprim-sulfamethoxazol-ra volt érzékeny (MIC 0,25-0,5 mg/L) és magasszintű rezisztenciával rendelkező colistinnal szemben (MIC 16-32 mg/L) (1. táblázat). A különböző országokban leírt KPC-termelő ST258 izolátumok túlnyomó többsége érzékeny colistinre, amelynek használata újra előtérbe került súlyos betegek MDR vagy XDR Gram-negatív baktériumok okozta fertőzéseinek kezelésében (11). Colistin rezisztens MDR *K. pneumoniae* törzsek megjelenésének okát Antoniadou és mtsai vizsgálták, és feltételezték, hogy a colistin rezisztencia a MDR *K. pneumoniae* törzsek körében a túlzott és nem megfelelő colistin használat szelekciós nyomására alakul ki. Ennek ellentmond,

hogy a KPC-termelő izolátumokat hordozó hazai betegek kórtörténetében colistin kezelést nem említene, mégis nagyon gyorsan kialakult magas szintű colistin rezisztencia.

A PCR vizsgálatok eredményei alapján egyik törzs sem hordozott *bla*<sub>CTX-M</sub> gént, azonban mind pozitív volt *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> és *bla*<sub>SHV</sub> génekre. A kiválasztott törzsek (K509/08, K97/09) szekvenálási eredményei szerint a törzsek az ST258 szekvencia típushoz tartoztak és *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub> és *bla*<sub>SHV-12</sub> géneket hordoztak. Ezek az eredmények – összhangban Samuelsen és mtsai megállapításával – arra utalnak, hogy az első hazai KPC-termelő *K. pneumoniae* valószínűleg Görögországból került Magyarországra, míg a további törzsek terjedésénél már helyi átvitel feltételezhető.

A hazai és norvég KPC-termelő izolátumok, valamint a CTX-M-15 termelő ST11 hazai izolátumok (S pulstípus, epidémiás klón III (ECIII), 2005-2009) PFGE vizsgálatának eredménye azt mutatta, hogy 85%-os hasonlósági szinten mindegyik vizsgált törzs egy genotípus csoportba tartozik, melyet két fő alcsoportra lehetett osztani (1. ábra). Az ST11 (ECIII) közel öt éves hazai terjedése során homogén struktúrát mutatott. Ugyanilyen genetikai stabilitást lehet felfedezni az összes KPC-termelő ST258 izolátum esetében. A két norvég és az első magyar izolátum PFGE mintázata teljesen megegyezett annak ellenére, hogy az izolálások között egy év eltérés volt.

Az MLST adatbázis alapján az ST11-t nemcsak Magyarországon, hanem Spanyolországban és Koreában is megtalálták. Az ST258-t, amely a hét vizsgált gén közül csak egyben tér el az ST11-től, megtalálták már Norvégiában, Svédországban (4), Izraelben, USA-ban (3), Lengyelországban (5) és Koreában (<http://www.pasteur.fr/mlst>). Tekintve, hogy az MLST alapján egy klonális komplexbe (clonal complex, CC) tartozónak tekintik azokat a törzseket, melyek szekvencia típusa maximum egy génben tér el az azonos csoportba tartozóktól, valamint a PFGE, az MLST tipizálás eredménye és az ST11 és ST258 törzsek SHV-11 hordozása alapján úgy tűnik ez az első leírt hiperepidémiás klonális komplex (CC11) a *K. pneumoniae* esetében, mely jelenleg a világ minden táján elterjedt.

## Irodalomjegyzék

1. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 470-82.
2. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**: 1151-61
3. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB *et al.*, Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; **53**: 3365-70.
4. Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S *et al.* Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 654-8.
5. Baraniak A, Izdebski R, Herda M *et al.* The emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jul 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19620323.
6. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*. 2008; **20**: 47
7. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, *et al.* Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother*. 2008; **62**: 978-85
8. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 2723-5.
9. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3026-9.
10. Diancourt L, Passet V, Verhoef J *et al.* Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4178-82.
11. Li J, Nation RL, Turnidge JD *et al.* Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**: 589-601.
12. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G *et al.* Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 786-90.
13. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, *et al.* eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004; **186**: 1518-30.



1 táblázat. KPC-2-termelő *K. pneumoniae* izolátumok klinikai jellemzői és antibiotikum érzékenysége

Izolátum száma (OEK)	Beteg	Nem/kor <sup>a</sup>	Izolálás helye <sup>b</sup>	minta	MIC (mg/L) <sup>c</sup>												
					CAZ	CTX	ETP	IPM	MEM	TET	TGC	CIP	GEN	AMK	SXT	CST	
K509/08	SS	F/57	BAZ-MK	felső légúti	>256	256	8	16	8	16	2	>324	64	>32	0,5		
K97/09	BB	N/67	MISEK-SK	seb	>256	256	8	32	32	64	2	>324	64	0,5	16		
K105/09	TI	N/62	BAZ-MK	széklet	>256	256	16	>32	16	32	4	>324	64	0,25	16		
K120/09	KBT	N/27	BAZ-MK	felső légúti	>256	32	16	>32	8	32	2	>322	64	0,5	32		
K132/09	MA	F/85	BAZ-MK	alsó légúti	>256	128	8	>32	32	16	2	>324	64	0,5	16		
K153/09	TI	N/62	BAZ-MK	seb	>256	256	32	>32	8	16	2	>322	64	0,5	16		
K160/09	LI	F/66	MISEK-D	CVC	>256	256	8	>32	32	16	2	>324	64	0,5	32		
K167/09	ZsJ	F/81	MISEK-D	alsó légúti	>256	64	16	>32	8	16	2	>322	64	0,5	16		
K168/09	KBT	N/27	BAZ-MK	széklet	>256	64	16	>32	>32	16	2	>322	64	0,5	32		

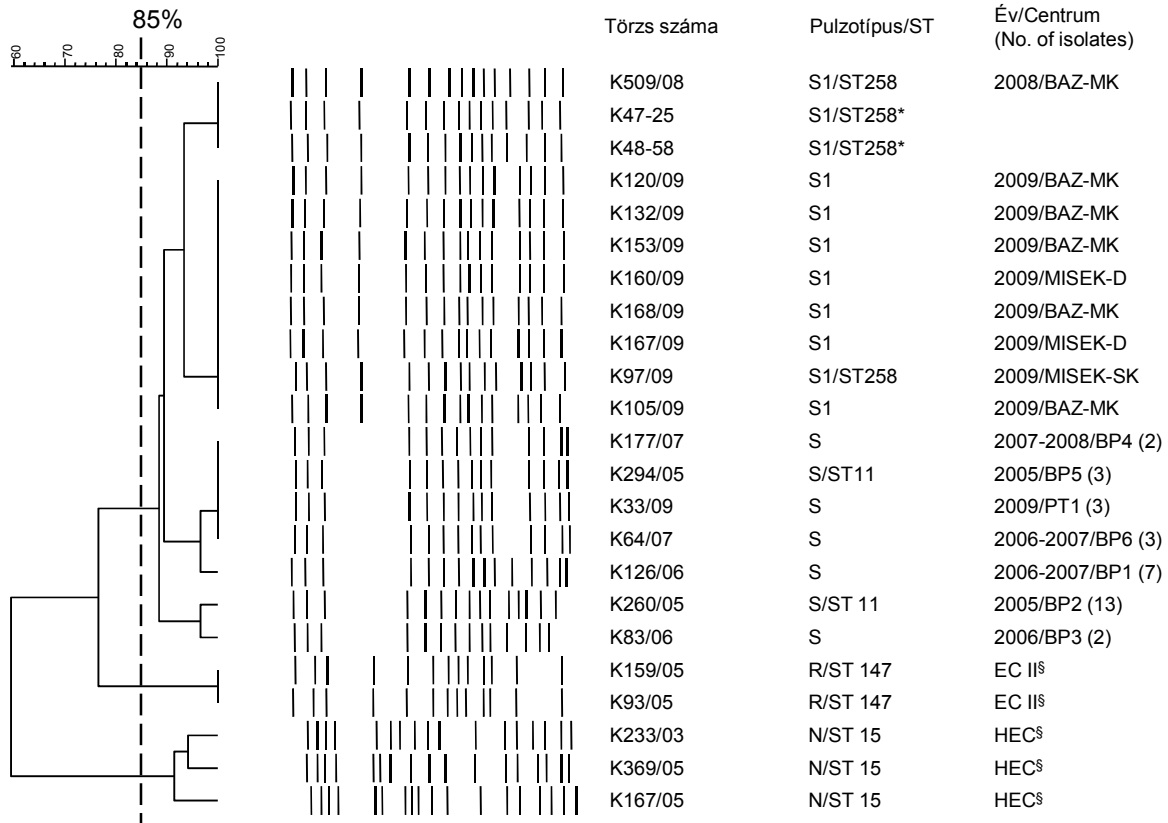
<sup>a</sup>F, férfi; N, nő.

<sup>b</sup>BAZ-MK, Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház, Miskolc; MISEK-SK, Miskolc Egészségügyi Központ – Semmelweis Kórház, Miskolc; MISEK-D, Miskolc Egészségügyi Központ -Diósgyőr, Miskolc.

<sup>c</sup>CAZ, ceftazidim; CTX, cefotaxim; ETP: ertapenem; IPM, imipenem; MEM: meropenem; TET, tetracyclin; TGC: tigecyclin; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazol; CST: colistin.

1 ábra. Kilenc KPC-2-termelő és 33 CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* törzs makrorestrikciós profilon (MRP) alapuló dendrogramja, valamint a kiválasztott törzsek szekvencia típusa. ECII és HEC törzsek MRP-je szintén látható az ábrán.

Dice (Opt:1.00%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]



\* Norvégiában izolált KPC-2-termelő *K. pneumoniae* törzsek<sup>4</sup>  
 § ECII, Epidémiás klón II; HEC (Hungarian Epidemic clone)<sup>7</sup>

## **Az OEK Bakteriológia I. osztályra beküldött *Streptococcus pneumoniae* törzsek szerotípus meghatározásának aktuális adatai.**

Tirczka Tamás

A *Streptococcus pneumoniae* a felső légutak normálflórájának a tagja. A pneumococcus baktérium és patogén szerepe már a múlt század közepe óta ismert. Az általa okozott fertőzések napjainkban sem vesztek jelentőségükből. Mind a nagy halálozással járó invazív pneumococcus betegség (IPD), mind a kisgyermekkorban gyakoribb otitis media, illetve a bármely életkorban, de leginkább idősokban kifejlődő pneumococcus okozta pneumóniák ma is jelentős morbiditással és esetenként halálos kimenetellel járó betegségek. A *S. pneumoniae* által okozott infekciók: invazív fertőzések, mint pl. a meningitis, a pneumonia és a bacteraemia, a nem invazív fertőzések, mint pl. a sinusitis, az otitis media és a conjunctivitis. A fentiekén kívül kóroki szerepe lehet az osteomyelitis, szepikus arthritis, endocarditis, peritonitis, cellulitis és agytályog kialakulásában is.

Az általa okozott betegségek nagy része megelőzhető védőoltással, amelynek nem elhanyagolható vonzata az antibiotikum felhasználás csökkenése.

Az első, csecsemők és kisgyermekek immunizálására alkalmas 7-valens konjugált pneumococcus vakcinát (PCV-7) 2000-ben az USA-ban, 2001-ben Európában törzskönyvezték. A vakcina (Prevenar TM, Wyeth) 0,5 mg alumínium-foszfáthoz adszorbeált, CRM 197 elnevezésű fehérjéhez konjugált 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, és 23F szerotípusú *Streptococcus pneumoniae* baktériumtörzseket tartalmaz.

2009. nyarán törzskönyvezték és került forgalomba a PCV-10 (Synflorix GlaxoSmithKline) vakcina, majd 2009. szeptember 24-én fogadta el a WHO a PCV-13 vakcinát, amely várhatóan hamarosan Magyarországon is forgalomba kerül.

Mint minden védőoltással megelőzhető betegség esetében, a pneumococcus-betegség vonatkozásában is fontos a surveillance, hogy a járványügyi szakemberek megfelelő mennyiségű és minőségű információt szolgáltatassanak a döntéshozók számára a betegség előfordulásáról, az általa okozott társadalmi teherről és a vakcináció hatásáról. Jelenleg sok európai országban nem ismert, milyen szerotípusú pneumococcus törzsek cirkulálnak az országban. Ennek fényében napjainkban Európa számára, így hazánkban is prioritás a pneumococcus-betegség surveillance rendszerének kialakítása és fenntartása, a betegségre és a kórokozó szerotípusokra vonatkozó információk gyűjtése és

összehasonlítása a PCV-7 illetve az újonnan megjelenő konjugált vakcinákban lévő szerotípusokkal.

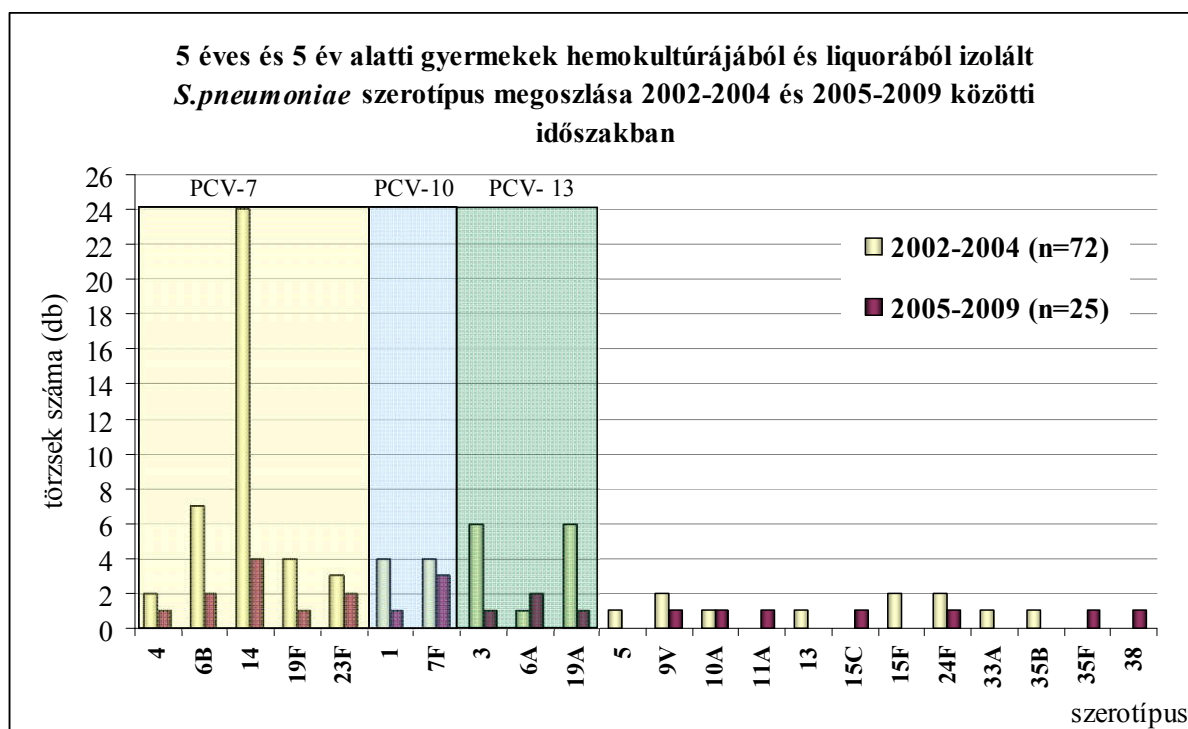
2008. október 16-án az OEK körlevelet adott ki a hazai mikrobiológiai laboratóriumok számára tájékoztatásként, hogy „Az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) 2008. szeptember 1-től elindítja a *Streptococcus pneumoniae* által okozott invazív megbetegedések hazai surveillance rendszerét”, melyhez kérte a laboratóriumok segítségét, hogy az invazív mintákból származó pneumococcus törzseket szerotipizálás céljából küldjék be az OEK Bakteriológia I. osztályára.

2008 novemberétől már nemcsak a kitenyészett *S. pneumoniae* szerotipizálására van lehetőség az OEK Bakteriológia I. osztályán, hanem tenyésztési eredménytelenség esetén, hasonlóan a *N. meningitis*-hez, a vérből vagy liquorból a pneumococcus közvetlen kimutatását (PCR) is lehet kérni.

A szerotipizálást a jelenleg standard módszernek számító ún. Quellung- (vagy tokduzzadási) reakcióval végezzük, mellyel 90 szerotípust tudunk meghatározni. A szükséges tipizáló savókat a Statens Serum Institute (Dánia, Koppenhága) gyártja. A tokduzzadási reakció a pneumococcus tok poliszacharid és a homológ antitest közötti reakció eredménye. Ha a tok láthatóvá válik, a reakció pozitív. A pozitív reakció *in situ* immunprecipitáció révén jön létre, ami a törésmutató változását eredményezi. Ezt a változást fáziskontraszt mikroszkóp alkalmazásával értékelhetjük.

2002 és 2004 között már lezajlott egy felmérés, még a PCV-7 konjugált vakcina bevezetése előtt, az invazív pneumococcusok szerotípusainak vizsgálatával kapcsolatban, melyben az 5 év alatti korosztály kiemelt csoportként szerepelt. A beküldött törzsek hemokultúrából, liquorból és pleura punktatumokból származtak. 2004 után is kaptunk szerotipizálás céljából törzseket a laboratóriumokból, de azok évenkénti száma elhanyagolható volt. A 2008. októberi felhívást követően megemelkedett a szerotipizálásra küldött izolátumok mennyisége. Míg a 2002-2004-es időszakban feltétel volt az 5 év alatti kor, jelenleg már minden IPD-s mintából, életkortól függetlenül kérjük a törzsek beküldését.

A szerotípusok változásának követésére minél több adatra van szükség, mert korrekt, a valóságnak megfelelő adatok csak nagyszámú anyag és több évig tartó vizsgálat alapján nyerhetők.



1. ábra

Az 5 év alatti korosztályban lehetőség van a PCV-7 bevezetése előtti és utáni minták szerotípusainak összehasonlítására. Megjegyzendő, hogy a kapott adatokat óvatosan kell értékelnünk, hiszen jelenleg ebben a korosztályban még nincs elegendő - legalább az előző ciklussal egyező számú - pneumococcus törzsünk. Az 1. ábra diagramja a két ciklusban hemokultúrából és liquorból izolált pneumococcus törzsek szerotípusainak megoszlását hasonlítja össze. Az izolált szerotípusok száma gyakorlatilag megegyezik, de összetételük a vizsgált időszakokban némileg eltér. Míg 2002-2004 között a leggyakoribb szerotípusok a 14, 6B, 3 és a 19A voltak, a 2005 utáni időszakban a jóval kisebb számú törzs megoszlott a különböző szerotípusok közt, kétféle szerotípusból volt több ez a 14 és 7F, de a 14-es szerotípus száma is lényegesen csökkent, a korábbi időszakhoz viszonyítva. Természetesen csak nagyszámú vizsgálat esetén lehet megfelelő képet alkotni a szerotípusok változásairól ebben a korcsoportban is. A szerotípusok vakcina általi lefedettségét az egyes oltóanyagok tekintetében az alábbi, 1. táblázatban foglaltuk össze:

1. táblázat A szerotípusok vakcina általi lefedettsége az egyes oltóanyagok tekintetében az 5 év  $\geq$  korosztályban.

	PCV-7	PCV-10	PCV-13
2002-2004. év	40/72 (55,6%)	48/72 (66,7%)	61/72 (84,7%)
2005-2009. év	10/25 (40%)	14/25 (56%)	18/25 (72%)

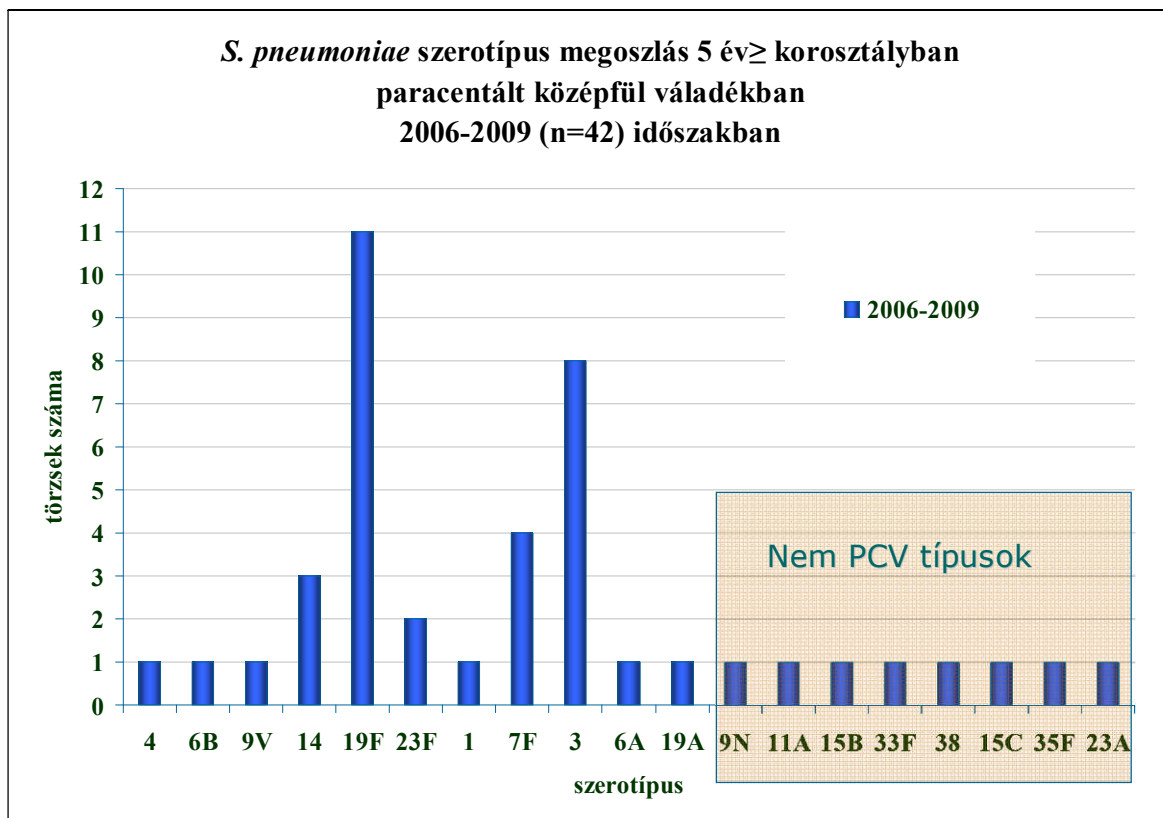
Az oltások következtében várható a vakcina szerotípusokon kívüli szerotípusok gyakoriságának növekedése.

Egyéb korosztályban még nincs lehetőségünk összevetni adatokat egymással, mert a PCV-7 bevezetését megelőzően ilyen jellegű felmérést nem végeztünk. Az adatok ismerete azonban a későbbi változások értékelése szempontjából fontos lehet.

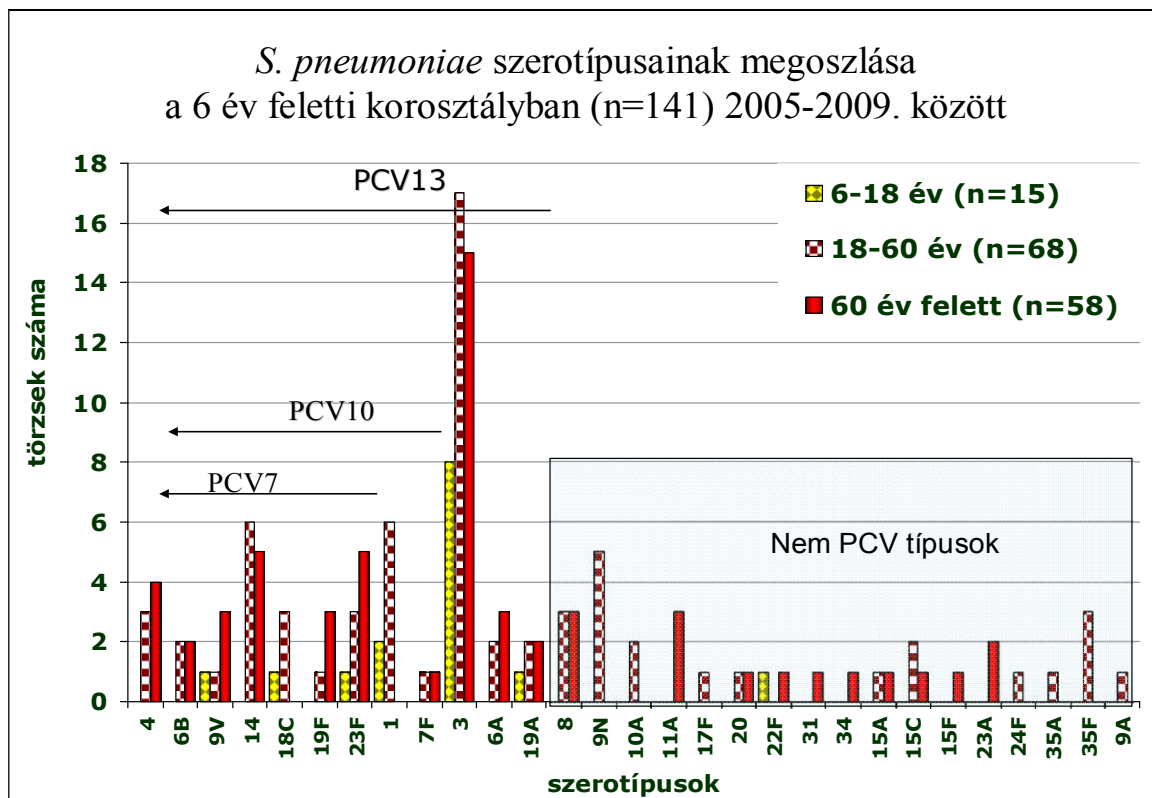
Már a bevezetőben említettük a *S. pneumoniae* okozta otitis media-t amely a gyermekkorban igen gyakori megbetegedés. 2008 októberétől az ezzel a diagnózissal beküldött törzseket is szerotipizáljuk. Bár szoros értelemben nem tartozik az invazív fertőzésekhez, egyes esetekben azonban otogén meningitis kialakulásához vezethet, ezért fontosnak tartjuk a szerotípusok megoszlásának vizsgálatát ebben a mintacsoportban is. Az eddigi vizsgálataink alapján (2. ábra) úgy tűnik, hogy a középfülgyulladásokban a leggyakoribb szerotípus 19F, majd ezt követi a 3, 7F, 14.

A 6-18 év, 18-60 év és a 60 év feletti korosztály szerotípusainak gyakoriságát a 3. ábra szemlélteti. Az adatok alapján elmondható, hogy mindegyik kategóriában a vezető szerep a 3-as szerotípusé. A 6-18 éves korosztályban 7-féle szerotípust határoztunk meg, a 3-as dominanciája szembetűnő. A 18-60 közötti korosztály jelenlegi 23 –féle szerotípusából a 3-as mellett jelentősebb számban található az 1, 14 és 9N. A 60 év feletti korcsoportban a 20 – féle szerotípusból a 3-as mellett a 14, 23F és a 4 fordult elő nagyobb számban.

A hatvan év feletti csoportban a PCV vakcinák általi szerotípus lefedettség **PCV-7** 37,9%, **PCV-10** 39,7% és a **PCV-13** 74,1% szerint alakul.

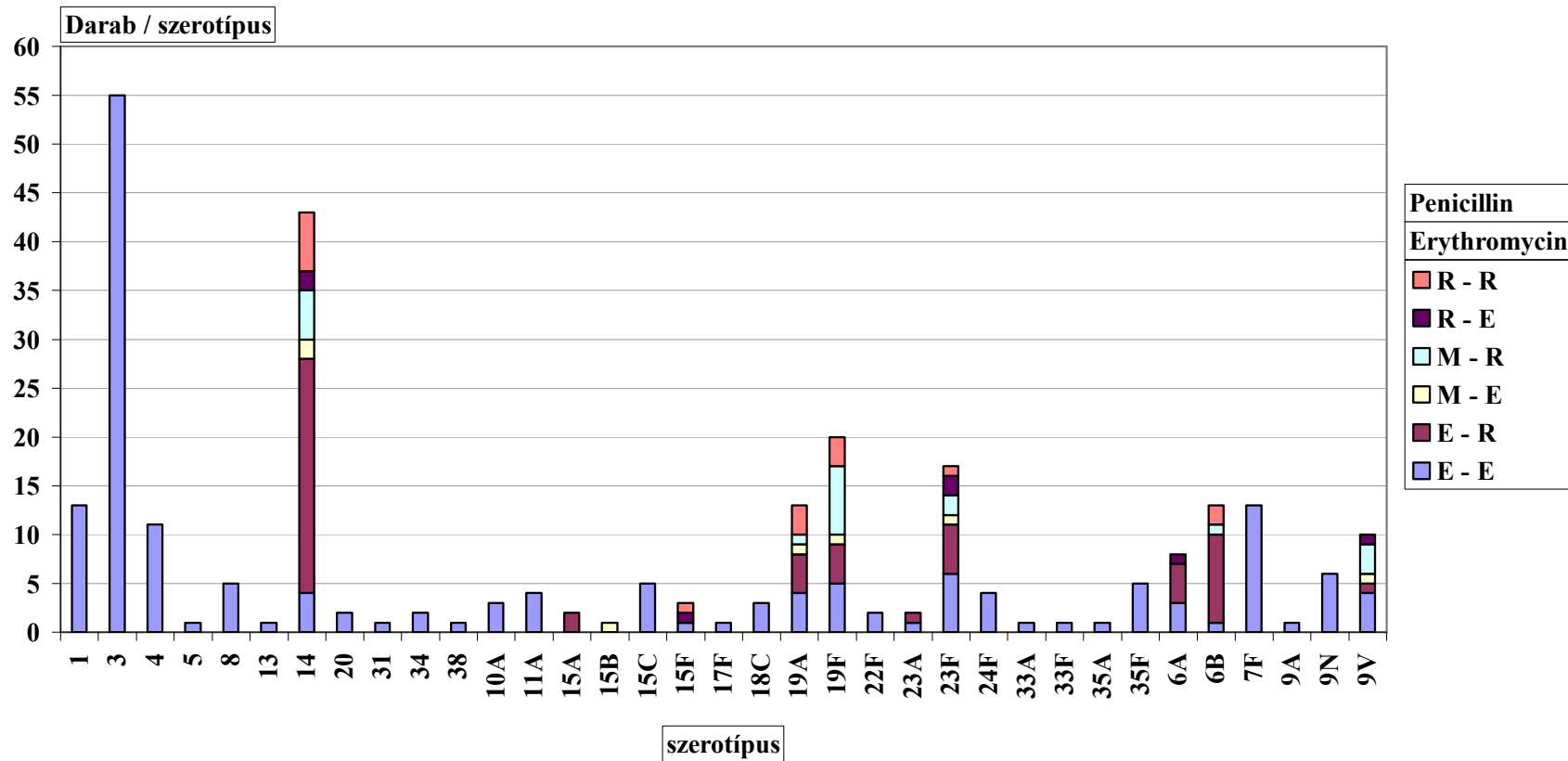


2. ábra



3. ábra

*S.pneumoniae* penicillin és erythromycin érzékenysége szerotípusok szerinti megoszlásban 2002-2009 között. (n=274)





Megjegyzés: A jelmagyarázatban a baloldali sor a penicillinre a jobb oldali sor az erythromycin értékekre vonatkozik.

Érdemes néhány szóban megemlíteni az antibiotikum rezisztenciával kapcsolatos tapasztalatokat is. Az értékelést a CLSI 2009. évi kiadása alapján végeztük. A *S. pneumoniae* penicillin és erythromycin érzékenységi adatait szerotípusonkénti bontásban elemezve, elmondható, hogy az eddig szerotipizált 35 –féle szerotípus többsége mind a penicillinnel mind pedig az erythromycinnel szemben érzékenynek bizonyult. 10 szerotípus esetében azonban penicillinnel és/vagy erythromycinnel szemben tapasztalható rezisztencia. A rezisztens törzsek többnyire a PCV-7 vakcina szerotípusai közé tartoznak. (14, 19F, 23F, 6B). Penicillinnel szembeni magas fokú rezisztenciával (MIC>8 µg/ml)rendelkező, invazív mintából származó törzset eddig még nem találtunk. A makrolid rezisztencia ezzel szemben magas értéket mutat. A szerotipizált törzsek 32,4%-a volt rezisztens az erythromycinnel szemben.

Még egyszer szeretnénk felhívni a laboratóriumok figyelmét arra, hogy vegyenek részt a hazai invazív pneumococcus betegség surveillance-ában. Kérjük, hogy továbbra is küldjenek be (vagy ha eddig még nem küldtek be, ezután tegyék meg) minden IPD –ből származó *S. pneumoniae* törzset szerotípus meghatározás céljából. A törzseket lehetőség szerint az izolálást követően a lehető legrövidebb időn belül továbbítsák az **OEK Bakteriológia I. osztályára**, D-pálcán, vagy transzport táptalajban. A szükséges kísérőlapot (adatlapot) az OEK honlapjáról ([www.oek.hu](http://www.oek.hu)) tölthetik le: „*Beküldőlap Streptococcus pneumoniae szerotípus meghatározásához*”. Kérjük, hogy az adatlapot értelemszerűen, pontosan töltsék ki. **A diagnózis kitöltése az adatlapon kiemelt jelentőségű.**

Köszönjük, hogy segítik a *Streptococcus pneumoniae* által okozott invazív megbetegedések hazai járványügyi helyzetének pontosabb megismerését célzó surveillance tevékenységünket.

## Helyesbítő kiegészítés

A Mikrobiológiai Körlevél 2006.évi 1. számának 17 oldalán található 1. táblázatában az alábbi kiegészítések és helyesbítések történtek:

1. táblázat Az aerob antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz szükséges kontroll törzsek.

### A rezisztencia fenotípusos vizsgálatához és a screen lemezekhez:

		ATCC azonosító	HNCMB azonosító
<b>6 µg/ml oxacillin és 4% NaCl tartalmú Mueller-Hinton táptalaj</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	oxacillin érzékeny	29213	112010
<i>Staphylococcus aureus</i>	oxacillin rezisztens	43300	112013
<b>Aminoglikozid high level rezisztencia; 6 µg/ml vancomycin tartalmú BHI</b>			
<i>Enterococcus faecalis</i>	vancomycin rezisztens	51299	80235
<i>Enterococcus faecalis</i>	vancomycin érzékeny	29212	80234
<b>Makrolid indukálta clindamycin rezisztencia</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>		BAA-976	110024
<i>Staphylococcus aureus</i>		BAA-977	110025
<b>EGYÉB</b>			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL pozitív	700603	52134
<i>S. aureus</i> MU50	VISA	700699	112017
<i>S. aureus</i> MU3	hVISA	700698	112016