

Tartalom:

1. Védekezési lehetőségek az antibiotikum rezisztencia terjedésének megakadályozására.
Füzi Miklós

**2. Magyarországon izolált közösségben szerzett CA-MRSA gyanús
izolátumok mikrobiológiai sajátosságai**
Tóth Ákos, Ungvári Erika, Gacs Mária

3. A centrális kanül eredetű szepszis mikrobiológiai diagnosztikája
Hajdú Edit, Szegedi Tudományegyetem Klinikai Mikrobiológiai
Diagnosztikai Intézet

**4. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok
Korongdiffúzió**
Gacs Mária, Tóth Ákos, Tirczka Tamás, Füzi Miklós

**5. *Stenotrophomonas maltophilia* antibiotikum érzékenységi vizsgálatának
nehézségei**
Kristóf Katalin, SE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai Intézet

**6. Országos összehasonlító és referencia vizsgálatok céljára az OEK Bakteriológia I.
osztályra beküldendő izolátumok jegyzéke**

Védekezési lehetőségek az antibiotikum rezisztencia terjedésének megakadályozására.

Füzi Miklós

2005. december 12-13. Birmingham, Nagy Britannia

Beszámoló kongresszusi részvételről

A konferencia vezető témája az újfajta, rezisztens kórokozókkal szemben is hatékony antibiotikumok kifejlesztésének kérdése volt. Számos előadó hangsúlyozta, hogy míg az 1950-es évektől az 1980-as évek második feléig a nagy cégek rendszeresen előállítottak újfajta antibiotikumokat, addig az utóbbi 20 évben ezek száma jelentősen csökkent. A legnagyobb problémát az okozza, hogy míg az antibiotikum rezisztencia aránya folyamatosan növekszik (különösen a *Staphylococcus aureus* és egyes Gram-negatív nozokomiális kórokozók esetében), úgy tűnik, esély sincs arra, hogy a gyógyszergyártó cégek olyan új típusú antibiotikumokat fejlesszenek ki, amelyekkel a multirezisztens pathogének által okozott fertőzéseket eredményesen lehetne kezelni. A kérdéstről több előadás is elhangzott, amelyekből azt az egyértelmű következtetést lehetett levonni, hogy a jelenlegi igen hosszú és bonyolult gyógyszer-honosítási eljárás mellett a cégek számára nem kifizetődő újfajta antibiotikumok kifejlesztése. A Glaxo Ltd. képviselője pontos szám adatokkal is alátámasztotta, hogy az újfajta antibiotikumok kifejlesztése mennyire előnytelen a cégek részére. A helyzet javítása érdekében az Európai Bizottság (European Commission) jelenlévő képviselői ígéretet tettek, hogy kezdeményezni fogják a gyógyszer-honosítási eljárás egyszerűsítését.

Számos előadó hangsúlyozta, mekkora problémát jelentenek mind a házi orvosi konzultációk legnagyobb részét kitevő „közösségben szerzett fertőző betegségek”, mind az Európa több országában egyre jobban terjedő, multirezisztens pathogének által okozott, nozokomiális infekciók. A védekezéshez a megfelelő laboratóriumi háttér is hozzátartozna, ami lehetővé tenné a gyors és pontos diagnózist. Ezáltal pl. elkerülhető lenne, hogy a felső légúti vírusos infekciókban fölösleges antibiotikum kezelésre kerüljön sor. Az új antibiotikumok kifejlesztésén kívül fontosnak tartják még a védőoltással történő védekezést is. Ebben a vonatkozásban elsősorban a *Streptococcus pneumoniae* conjugált vakcina jelentőségét hangsúlyozták, de van már olyan cég is, amelyik arra számít, hogy nem fog sor kerülni újfajta antibiotikumok kifejlesztésére és megkezdte oltóanyag, illetve antitest előállítását a legfontosabb nozokomiális kórokozók ellen.

A *Staphylococcus aureus* elleni vakcina kifejlesztése már előrehaladott stádiumban van és dolgoznak számos Gram-negatív pathogén elleni oltóanyag előállításán is.

Programként az antibiotikum rezisztencia helyzet javítására, ill. a fertőzések megelőzésére a konferencián az alábbi fontosabb ajánlások fogalmazódtak meg.

1. Az antibiotikum rezisztencia helyzet folyamatos monitorozása mikrobiológiai surveillance révén, mind az EU szintjén, mind országos szinten.
2. Megfelelő diagnosztikai háttér létrehozása a fertőzések gyors és megbízható felismerésére.



3. A „szakmailag megalapozott” antibiotikum felhasználás bevezetésének szorgalmazása az EU országokban. (Az Európai Bizottság az Ausztriában már bevált antibiotikum „guideline”-t fogadta el és fogja ajánlani a tagországoknak.)
4. Az újfajta antibiotikumok honosításának egyszerűsítése.
5. Oltóanyagok kiterjedtebb használata, illetve bevezetése a fertőző betegségek megelőzésére.

Magyarországon izolált közösségben szerzett CA-MRSA gyanús izolátumok mikrobiológiai sajátosságai

Tóth Ákos, Ungvári Erika, Gacs Mária

A közösségben szerzett (CA)-MRSA törzsek jellegzetességeiről, magyarországi megjelenéséről és ennek jelentőségéről a Mikrobiológiai Körlevél 2004/2. számában már beszámoltunk. A CA-MRSA infekció gyanús esetek monitorozása a Nemzeti MRSA Referencia Laboratóriumba (NMRL) és a Fágtypizálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztályra (FMEO) beküldött MRSA törzseken azóta is tovább folyik. A hazai publikációk és a témához kapcsolódó előadások hatására, 2004. és 2005.-ben több esetben is küldtek intézetünkbe „CA-MRSA infekció gyanú” megjegyzéssel törzseket, ami azt mutatja, hogy a klinikai mikrobiológiai laboratóriumok egyre inkább odafigyelnek az új veszélyforrás jelenlétére. A CA-MRSA infekció tényének megállapítása csak az epidemiológiai adatok ismeretében lehetséges, melyek gyűjtését „Közösségi (CA) MRSA fertőzési adatlapokon” folyamatosan végezzük

Jelen írásunkban a járványügyi adatok alapján alátámasztott CA-MRSA fertőzésekből izolált törzsek mellett, a mikrobiológiai eredmények alapján CA-MRSA fertőzésnek tűnő, de epidemiológiailag még nem alátámasztott esetek MRSA törzseiről is beszámolunk.

2004. január és 2005. augusztusa között intézetünkbe 2682 MRSA törzset küldtek be megerősítésre, tipizálásra. A CA-MRSA infekció lehetőségét a törzsekkel beküldött kísérőlapok adatai alapján állapítottuk meg. A következő kritériumokat vettük figyelembe (fontossági sorrendben):

1. a törzsek antibiogramja (többnyire csak béta-laktámokra rezisztens, és arra is inkább alacsony szinten)
2. a klinikai minta típusa (sebváladék, abscessus, orr-torok váladék, alsó légúti váladék)
3. klinikai diagnózis - bőr-lágyrész infekciók, alsó légúti megbetegedések
4. ellátás típusa - járóbeteg ellátás
5. beteg életkora - gyerekek, fiatal felnőttek

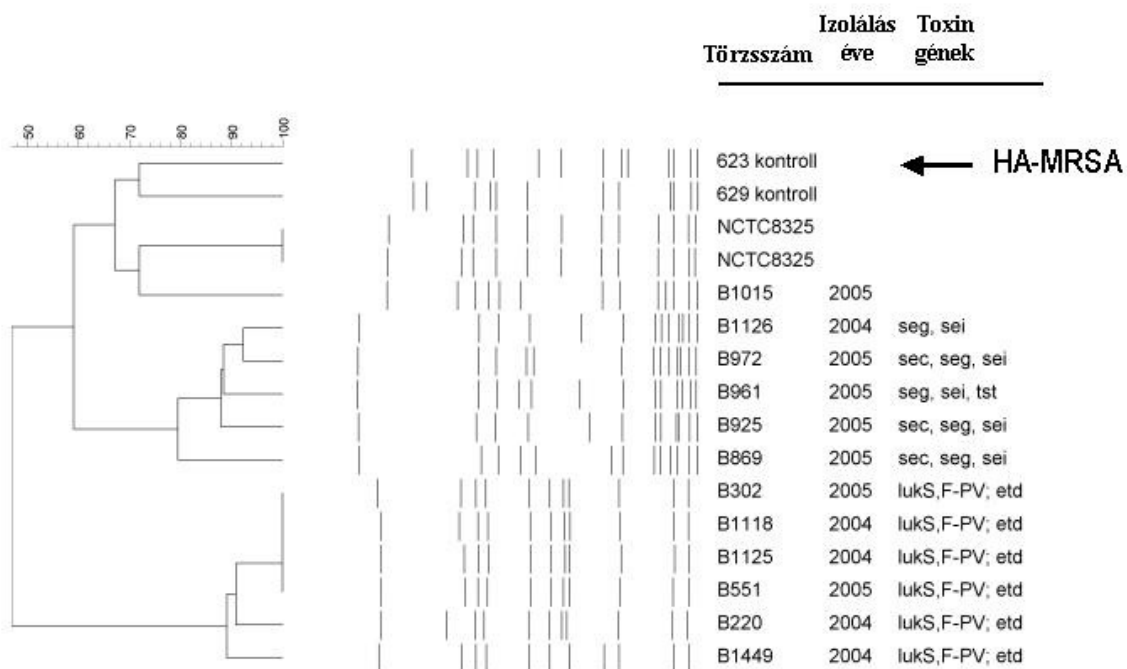
A kritériumok alapján 15 MRSA törzset választottunk ki további vizsgálatokra. Vizsgáltuk a törzsek antibiotikum érzékenységét (MIC meghatározás, D-teszt), az általuk hordozott toxin géneket (*lukS-PV/lukF-PV* (PVL), *eta*, *etb*, *etd* (exfoliatív toxin A, B, D), *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *sei* (enterotoxin A-I), *tst* (TSST-1)), és *SCCmec* kazetta típusát PCR-módszerrel. A törzsek rokonságának feltérképezésére PFGE mellett a szekvencia-alapú tipizálási módszerek közül a *spa*-tipizálást és a multilókuszos szekvencia tipizálást (MLST) használtuk. Munkánkat a portugál Laboratório de Genética Molecular (Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa) intézettel együttműködve végeztük el.

A mikrobiológiai vizsgálatok eredményei (1. táblázat):

1. táblázat : Hazai CA-MRSA gyanús és igazolt törzsek mikrobiológiai sajátosságai

Törzs szám / izolálás éve	SCCmec típus	PFGE típus	szekvencia típus (ST)	Toxin gének										Antibiotikum												
				<i>lukS-PV/lukF-PV</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>etd</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>sei</i>	<i>tst</i>	Oxacillin MIC (mg/L)	Ciprofloxacín	Gentamicin	Kanamycin	Vancomycin	Rifampin	Tetracyclin	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Erythromycin	Clindamycin	Fusidic acid
302/05	IVc	A1	80	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	64	E	E	R	E	E	E	E	E	E	E	R
551/05	IVc	A1		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	48	E	E	R	E	E	E	E	E	E	E	R
1118/04	IVc	A2		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	32	E	E	R	E	E	E	E	E	E	E	R
1125/04	IVc	A3		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	24	E	E	R	E	E	M	E	E	E	E	R
1120/05	IVc	A3		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	64	E	E	R	E	E	M	E	E	E	E	R
220/04	IVc	A4		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	16	E	E	R	E	E	E	E	E	E	E	R
1449/04	IVc	A5	45	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	24	E	E	R	E	E	E	E	E	E	E	R	
1126/04	IVb	B1		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	24	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
972/05	IV	B2		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	16	E	E	E	E	E	E	E	Ri	E	E
961/05	IVa	B3		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	48	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
925/05	IVa	B4		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	24	E	E	E	E	E	R	E	E	E	E
869/05	IV	B5		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	96	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
1015/05	IVa	D1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	E	E	R	E	E	E	E	E	R	E	E	
1196/05	IV	D2		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	128	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
821/05	NT	E	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	

Tizennégy törzs hordozta az SCCmec kazetta IV-es típusát, egy törzs SCCmec kazettája nem volt besorolható a négy legismertebb típus egyikébe sem. A PFGE és MLST vizsgálatok eredményei alapján mindegyik törzs jól elkülönült a hazai kórházi (HA)-MRSA törzsektől (1. ábra).



1. ábra

A törzsek egyik csoportja (7 törzs) a „klasszikus” CA-MRSA törzsek mikrobiológiai sajátosságait mutatta: PVL és exfoliatív D toxint termeltek, kanamycin és fusidinsav rezisztensek voltak. Szekvencia típusuk ST80-nak bizonyult, mely az európai CA-MRSA törzsek között igen elterjedt. Ezt a típust írták le Németországban, Nagy-Britanniában, Franciaországban, Svájcban, Görögországban, Norvégiában, Dániában és Belgiumban is [1, 2, 3, 5, 9, 10, 11, 13]. Az epidemiológiai adatok szerint mind a 7 törzs bizonyítottan CA-MRSA infekciót okozott.

A további 8 törzs mind a PFGE, mind pedig a spa szekvencia tipizálási (MLST) eredmények alapján 3 csoportba volt besorolható.

Az ST45 típusba tartozó 5 törzs enterotoxin G-t és enterotoxin I-t, valamint 3 törzs enterotoxin C-t is termelt. Egy törzs hordozta a toxikus shock szindróma toxin génjét (tst) is. Egy törzs indukálható clindamycin rezisztencia fenotípust (iMLS_B) mutatott, egy másik pedig tetracyclinre volt rezisztens. Az ST45-MRSA-IV klón, mint Berlin-klón ismert, leírták már kórházi, és CA-MRSA fertőzéseket okozó klónként is [4, 6, 7, 11, 12]. Az epidemiológiai adatok gyűjtése ezekben az esetekben még folyik, azonban a betegek életkora, a minta származási helye és a diagnózisok CA-MRSA infekcióra utalnak.

Az ST8 típusba 2 törzs tartozott, az egyik a vizsgált toxin gének közül egyet sem hordozott, ugyanakkor efflux pumpán alapuló macrolid rezisztenciát, valamint kanamycin rezisztenciát mutatott. A másik törzs enterotoxin A-t és enterotoxin D-t kódoló gént hordozott és a béta-laktám antibiotikumokon kívül minden antibiotikumra érzékeny volt. Az ST8 szekvencia

típus is igen elterjedt a CA-MRSA törzsek körében különösen az USA-ban (USA300 klón), de leírták már Svájcban, Nagy-Britanniában, Skóciában, Írországbán, Ausztráliában, Németországban, Hollandiában, Franciaországban, Norvégiában, Belgiumban is [3, 8, 9] A beküldött epidemiológiai adatok alapján a két törzs CA-MRSA infekciót okozott.

Az ST7 szekvencia típusba tartozó törzs, szintén nem termelt egyetlen általunk vizsgált toxint sem, sőt az SCC mec kazetta típusát sem lehetett meghatározni. A szakirodalmi adatok szerint methicillin érzékeny *S. aureus* törzsek tartoznak ebbe a szekvencia típusba.

Vizsgálataink rámutattak, hogy szoros genetikai rokonság áll fent a PVL-pozitív CA-MRSA törzsek között (ST80-MRSA-IV). A PVL-negatív CA-MRSA gyanús törzsek már nem mutatnak olyan szoros rokonságot, s jól elkülöníthetők a PVL+ törzsektől. Mind a 15 MRSA törzs eltér a Magyarországon elterjedt, nosocomialis járványokat okozó MRSA izolátumoktól.

Fontos: Mivel a CA-MRSA infekciót kizárólag mikrobiológiai vizsgálatok alapján nem lehet megerősíteni/ elvetni, ezért kérjük, hogy a továbbiakban a CA-MRSA gyanús izolátumokat, a nemsokára az OEK honlapjára is kikerülő, kitöltött Közösségi (CA) MRSA fertőzési adatlapokkal küldjék be a Nemzeti MRSA Referencia Laboratóriumba vagy a Molekuláris Epidemiológiai Osztályra. Az eddig beküldött adatokat nagyon köszönjük!

Irodalom:

1. Denis O. et al.: Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harbouring Panton-Valentine Leucocidin genes in Belgium. J Antimicrob Chemother. 2005, 56: 1103-1106.
2. Faria N. A. et al.: Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol. 2005, 43: 1836-1842.
3. Hanssen A.-M. et al.: Dissemination of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Northern Norway: sequence types 8 and 80 predominate. J Clin Microbiol. 2005, 43: 2118-2124.
4. Harbath S. et al.: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Switzerland. Emerging Infectious Diseases. 2005, 11: 962-965.
5. Holmes A. et al.: *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine Leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. J Clin Microbiol. 2005, 43: 2384-2390.
6. Qi W. et al.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zürich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCC mec and a new element associated with isolates from intravenous drug users. J Clin Microbiol. 2005, 43: 5164-5170.
7. Regev-Yochay G. et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Neonatal Intensive Care Unit. Emerg Infect Dis. 2005, 11: 453-456.
8. Tenover F C: ORSA on PulseNet: Update (előadás). 8th Annual PulseNet Update Meeting, 2004., San Diego, CA, USA.
9. Vandenesch F. et al.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leucocidin genes: worldwide emergence. Emerg. Infect.Dis. 2003, 9: 978-984.
10. Vourli S. et al.: Community acquired MRSA infections in a paediatric population in Greece. Euro Surveill. 2005, 10: 78-79.
11. Wannet WJ et al.: Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine Leucocidin genes in the Netherlands. J Clin Microbiol. 2005, 43: 3341-3345.
12. Wannet W. J. B. et al.: Widespread Dissemination in the Netherlands of the epidemic Berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin. J Clin Microbiol. 2004, 42: 3077-3082.
13. Witte W. et al.: Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany. Euro Surveill 2004, 9: 16-18.

A centrális kanül eredetű szepszis mikrobiológiai diagnosztikája

Hajdú Edit

A kórházi ellátás során, de különösen az intenzív osztályos ellátáskor a betegek jelentős %-ánál (akár 90%) centrális kanül behelyezése válik szükségessé. A kanülok baktériumokkal való kolonizációját jelentősen késleltetheti a behelyezés és a kanül kezelés szabályainak szigorú betartása, de ennek ellenére a hosszan benntartott kanüloknél számolni kell a kolonizációval. A kanülon keresztüli folyadékbevitel a kolonizáló baktériumokat a véráramba sodorhatja, így átmeneti bakteriaemiát, vagy sepsist is okozva. A lázas beteg lázának forrását a bakteriológiai tenyésztésre küldött minták pontos, ajánlásnak megfelelő vételével lokalizálni lehet.

Eltávolított kanül tenyésztése:

1. Szemikvantitatív módszer

- a. Kb 2 cm katéterdarab külső felszínének tenyésztése azáltal, hogy a táptalaj felszínén végiggörgetjük. A módszer hátránya, hogy ezzel a technikával csak a katéter külső felszíne mintázható. Pozitívnak tekintendő a vizsgálat, ha >15 CFU tenyészik a táptalajon. Azoknál a katétereknél nagyobb a módszer érzékenysége, amelyek kevesebb, mint egy hete vannak a betegben. Az egy hétnél tovább az érben lévő katétereknél a baktériumok a katéter lumenén keresztül is beterjedhetnek, a fenti technikával ez nem vizsgálható. A módszer szenzitivitása 60%.
- b. A katéter belsejét atmoszással lehet megmintázni. A módszer technikailag nagyon nehezen kivitelezhető. Az egy hétnél hosszabb ideje használt kanüloknél kell számolni a lumenben megtelepedett baktériumokkal. A módszer szenzitivitása 40%.

2. Kvantitatív módszer:

Az eltávolított katéterdarab külső és belső felszínéről is eltávolíthatók a baktériumok, ha steril folyadékba helyezés után ultrahanggal kezeljük, vagy vortexeljük. A folyadékból csíraszámolást végzünk. A katéter fertőzött, ha $>10^2$ CFU/ml baktériumszám tenyészik a folyadékból. Mindkét módszer szenzitivitása 80%.

A kanülok tenyésztésének értékelésénél figyelembe kell venni, hogy nem a kanül teljes hosszát, hanem rendszerint a proximális végét tenyészítjük. A baktériumok kolonizálhatják a kanül bármely részét, tehát a tenyésztésre küldött minta lehet akkor is steril, ha a kanül disztálisabb területeit már kolonizálta baktérium.

A feltételezetten kanül eredetű szepszisek egy jelentős részénél a kanül nem távolítható el (pl. dializáló kanül). Ilyenkor a kanülon keresztül és párhuzamosan szűrt vénából vett hemokultúra párok tenyésztése javasolt. A párhuzamosan vett minták pozitívvá válásából következtetni tudunk arra, hogy a beteg lázát feltehetően a kanül fertőzöttsége okozta-e.

1. Abban az esetben, ha a kanülon keresztül vett hemokultúra pár legalább 120 perccel korábban válik pozitívvá, mint a perifériás vénából vett hemokultúra pár és az izolált baktériumspeciések és azok antibiogramja azonos, akkor ezzel igazoljuk, hogy a kanül okozta infekció áll fenn. A fentieket magyarázza az, hogy a kanült fertőző baktériumok nagyobb számban kerülnek a kanülon keresztül vett vérrel a hemokultúra palackba, így gyorsabban megváltoztatják a palack belső paramétereit, amely az automata pozitív jelzését váltja ki.

2. Abban az esetben, ha a párhuzamosan vett minták közel egyidőben (a pozitívvá válás között nem telik el 2 óra), vagy a szűrt vénából vett minták előbb válnak pozitívvá, akkor egyéb eredetű infekció állhat a szepszis hátterében (húgyúti, sebgyógyulás, epeút gyulladás, pneumonia stb.)
3. Abban az esetben, ha csak a kanülon keresztül vett minták válnak pozitívvá, vagy a kanülből vett párhuzamos mintából csak egy palack, akkor a kanül kolonizációja áll fenn. Ebben az esetben mérlegelni kell az adott kanül cseréjét.

A párhuzamosan tenyésztett minták pozitív prediktív értéke 63-73%, míg a negatív prediktív értéke 98-99%, tehát, ha a fenti módon vett hemokultúra párok bakteriológiai tenyésztése negatív, az nagy bizonyossággal igazolja azt, hogy a behelyezett kanülok nem kolonizálódtak, teljes hosszukban sterilek.

A kanül infekciók ilyen módon való bakteriológiai diagnosztikájának feltételei:

1. A hemokultúra palackokon pontosan jelöljék meg, hogy honnan vették a beleoltott vérmintát (kanül, több kanül esetén annak pontos helye, szűrt véna).
2. A hemokultúra palackok rövid időn belül inkubációs körülmények közé kerüljenek.
3. Az automatáról leolvasásra, vagy kiírásra kerüljön az idő eltelté, amely a palack behelyezése és a pozitív jelzés között eltelt (TTD: time to detection)
4. A tenyésztési eredményt tartalmazó leleten véleményadás formájában jelenjen meg a mikrobiológus szakember értékelése.

Irodalmi hivatkozás: Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections *CID* 32:1249-1272 (2001)

2004-ben a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvos és Gyógyszerésztudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar (SZTE SZAOGYC ÁOK) Újklínika Intenzív Osztályán fekvő betegektől vizsgált hemokultúrák tenyésztési eredményeinek értékelése.

Vizsgált betegek száma	Mintavételi periódusok száma	Hemokultúra palackok száma	Kanül kolonizációk száma	Kanül eredetű bakteriaemiák száma	Nem kanül eredetű bakteriaemiák szám	Mintavételi kontaminációk száma
57	114	558	35	2	4	3

Egy mintavételi periódusnak vettük az egy napon, vagy egymást követő két napon belül vett hemokultúrákat.

Mintavételi kontaminációnak tekintettük azokat az eseteket, amikor a palack legalább 72 órán túli inkubálás után vált pozitívvá, a párhuzamos mintákból csak egy palack jelzett pozitivitást és a palackból a szokásos bőrflóra aerob vagy anaerob baktériumai tenyészttek ki.

A kitenyésztett baktériumokat abban az esetben minősítettük azonos izolátumnak, ha a species és az antibiotikum rezisztencia is megegyezett.

2004-ben az SZTE SZAOGYC ÁOK Újklínika Intenzív Osztályán fekvő betegektől vizsgált hemokultúrából kitenyésztett baktériumok megoszlása baktérium specierek szerint.

	Kanül kolonizáció	Kanül eredetű bakteriaemia	Nem kanül eredetű bakteriaemia	Mintavételi kontamináció
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	1		
<i>Staphylococcus hominis</i>	6			2
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1			
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1		
<i>Enterococcus faecalis</i>	2		1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1		2	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1			
<i>Escherichia coli</i>			1	
<i>Proteus mirabilis</i>			1	
<i>Propionibacterium acnes</i>				1
Összes izolált baktérium/esetszám	38/35	2/2	5/4	3/3

Baktériumok azonosítása:

- Gram-negatív baktériumok VITEK 2 (bioMerieux)
- *Enterococcus faecalis* ATB Strep (bioMerieux)
- *Staphylococcus aureus*: pigment termelés, hemolízis, koaguláz próba, polymyxin-B, novobiocin érzékenység, DN-áze próba, mannit bontás
- Koaguláz negatív staphylococcusok: pigment termelés, hemolízis, koaguláz próba (cső koaguláció, clumping faktor), polymyxin-B, novobiocin érzékenység, 7 cukrot tartalmazó biokémiai sor (dextróz, trechalóz, mannit, szacharóz, maltóz, xylóz, laktóz), ureum bontás

Antibiotikum rezisztencia vizsgálat:

- Korongdiffúziós módszer
- A szakmai ajánlásnak megfelelő esetekben MIC érték meghatározás E teszttel
- VITEK 2-vel történő antibiotikum rezisztencia meghatározás

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok Korongdiffúzió

Gacs Mária, Tóth Ákos, Tirczka Tamás, Füzi Miklós

A bakteriológiai vizsgálatra érkező anyagokból izolált kórokozók lehető leghitelesebb antibiotikum érzékenységének vizsgálata minden laboratórium legfőbb feladata.

A vizsgálat célja bakteriális infekcióban szenvedő betegek mintáiból kitenyészhető feltételezett kórokozók antibiotikumokra való érzékenységének, egyúttal az egyes antibiotikumokkal szemben szerzett másodlagos rezisztenciájának meghatározása, az adott baktériumra szokásosan hatékony szerek alkalmazásával.

Az antibiotikum érzékenység vizsgálatának többféle lehetősége van.

A **korongdiffúzió** a rutin antibiotikum érzékenységi vizsgálatok leggyakoribb, nemzetközi szinten elfogadott és alkalmazott módszere.

A rutin vizsgálatokban konkrétan: Érzékeny (É), Mérsékelten érzékeny (M) Rezisztens (R) kategóriák megállapítása a kapott gátlási zónák értékelésével a CLSI M100-S15 M2 Disc diffusion 2A-D táblázataiban a megadott értékhatárok alapján.

A módszer elsősorban a gyorsan növvő, aerob, nem tápigényes baktériumok vizsgálatára alkalmas, de alkalmazzák a táptalajhoz növekedést segítő szupplementek hozzáadásával, tápigényes baktériumok esetében is. A kivételeket, amikor korongdiffúziós érzékenységi vizsgálat nem nyújt egyértelműen megbízható eredményt, a CLSI (Clinical Laboratory Standard Institut) M100- S15, és a M2-A8 kiadványa species ill. genus szinten meghatározza, s azt is, amikor egyes speciesek esetében, bizonyos antibiotikumok vizsgálatára más módszert ír elő.

Az egyes speciesek esetében a CLSI/NCCLS-M100-S15 24-33 oldalain megadottak alapján az OEK Bakteriológia I. osztálya a mellékletben feltüntetett antibiotikumok vizsgálatát javasolja.

A vizsgálati módszer jellemzői.

Előnyei:

- technikailag egyszerű
- az érzékeny és rezisztens kategóriák jól reprodukálhatók
- szenzitivitása a rutinvizsgálatokhoz megfelelő, (amely esetekben nem, a CLSI más módszert ír elő)
- az eredmény a klinikus számára könnyen érthető
- a vizsgálandó antibiotikumok köre könnyen változtatható

A módszer korlátai

- nem alkalmas számos érzékeny, rosszul növvő Gram pozitív és Gram negatív baktérium antibiotikum érzékenységének vizsgálatára (pl. *Corynebacterium* spp. *Campylobacter* spp).
- nem alkalmas a *Staphylococcus* spp. és *Enterococcus* spp. glikopeptid érzékenységének meghatározására
- nem alkalmas a *S. pneumoniae* penicillinre mérsékelten érzékeny és rezisztens törzseinek differenciálására
- egyes baktérium speciesek vizsgálatára csak korlátozottan alkalmas, pl. *S. maltophilia*, *B. cepacia*,
- kvalitatív eredményt ad, amely elsősorban a törzs *in vitro* érzékenységére vonatkozik

A korongdiffúziós módszernek számtalan hiba lehetősége van, s eredménye is csak korlátozottan értékelhető, de a mindennapi rutin vizsgálatok nagy tömegének elvégzése, ma

még más módon nem lehetséges. Így, nagyon fontos az antibiotikum érzékenységi vizsgálat kivitelezésének minden előírását maradéktalanul betartani, s kiemelten szükséges ez a korongdiffúziós módszer esetében.

A korongdiffúziós módszer korlátai, a hibaforrások csökkentésének lehetőségei

Az eredményt befolyásoló tényezők

Az eredményt több tényező befolyásolja:

- A táptalaj megfelelő összetétele, pH-ja, megfelelő vastagsága és felszínének egyenletessége, nedvesség tartalma
- A vizsgálandó tenyészet kora és tisztasága
- A szuszpenzió sűrűsége, homogenitása és egyenletes eloszlása a táptalaj felszínén
- Az elődiffúziós idő tartama
- Az antibiotikum korongok hatóanyag tartalmának mennyisége
- Az inkubálási hőmérséklet, közeg és időtartam
- A vizsgálatot végző asszisztencia figyelmes, pontos munkája
- **A leolvasó diplomás szaktudásának szintje, és precizitása**

Kivitelezési eljárás

Előkészítés

- A feldolgozott vizsgálati mintából, 18-24 órai inkubálás után kapott tenyészetből, a amennyiben az színtenyészet, vagy kórokozónak tartható baktériumokból, amennyiben telep morfológia alapján jól elkülöníthetően, a 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenzióhoz elegendő számú, azonos, izolált telep áll rendelkezésre, elindítható a vizsgálat.
- Ha többféle telep morfológiát mutató, kórokozónak tartható baktérium telep látható a 24 órás táptalajokon, azokat, amelyekből biztonsággal nem készíthető el a szükséges szuszpenzió, újraszélesztjük és 24 órás színtenyészetből indítjuk az antibiotikum érzékenységi vizsgálatot. Az antibiotikum korongokat tartalmazó, előre láthatóan szükséges cartridgek-et (korongokat tartalmazó csövecskék) a hűtőből kivesszük és 1-2 óráig szobahőn, zártan tartjuk, a páralecsapódás s a korongok nedvesség felvételének elkerülése érdekében.
- A szükséges táptalajokat, ugyancsak néhány órán át szobahőn tartjuk, ha páralecsapódást észlelünk, a lemezeket termosztátban leszáritjuk. Ellenőrizzük az egyes táptalaj lemezek tisztaságát, a lemezek egyenletes 4mm-es vastagságát, homogenitását. A nem megfelelő, vagy szennyezést mutató táptalajokat, a vizsgálatból kizárjuk.

Inokulum készítése

Direkt szuszpenzió

- A vizsgálandó baktérium 18-24 órás tenyészetéből, gátlóanyagot nem tartalmazó táptalajról 3-5 nagyobb, vagy ennél több kisebb izolált telepet tüvel vagy kisfejú kaccsal, (tamponnal) megérintve 3 ml-steril fiz. NaCl oldatba 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítünk. A szuszpenzió sűrűségét kalibrált denzitométerrel vagy kereskedelmi forgalomban kapható ill. házilag készített McFarland standard sorozattal állítjuk be. (A direkt szuszpenzióval vizsgálandó baktériumok körét lásd az antibiotikum sorokhoz fűzött megjegyzések közt.)

Előtenyésztéssel nyert szuszpenzió: lásd. KJB. IV. 3.

Az inokulum leoltása

- Az elkészített szuszpenziót 15' belül a vizsgálandó speciesnek megfelelő táptalajra oltjuk. Adott specieseknek megfelelő táptalajt ld. a CLSI/NCCLS M-100 S15, 2A-D G és H táblázatában (34- 40, 44, 52 old.) Általában a gyártó által beállított kation koncentrációjú Mueller-Hinton táptalajt használunk, az igényesebb baktériumokhoz 5% vér

hozzáadásával. Leoltás előtt a szuszpenziót rázógéppel homogenizáljuk. Ezt követően a szuszpenzióból pipettával 100 µl-nyit, vagy üvegbottal felvett mennyiséget a táptalaj felszínére viszünk. A felvitt szuszpenziót steril vattapálcával vagy üvegbottal a Petri csészét 3x 60°-kal elforgatva, s ezt követően a táptalaj szélén kört írva le, egyenletesen elterítjük az agar felszínén. A leoltott lemezeket 15' állni hagyjuk, ha a lemezeken nedvességet észlelünk a lemezeket megfordítva, félig nyitva a Petri csésze fedelére támasztva szárítjuk.

A korongok felhelyezése

- A leoltott lemezeken 15' száradás után elhelyezzük az antibiotikum tartalmú korongokat. Az antibiotikumként 50 korongot tartalmazó cartridges-ből a korongokat steril eszköz (tű) segítségével enyhe nyomással vagy diszpenzerrel juttatjuk a leoltott táptalajok felszínére. 90 mm átm. Petri-csészét használva legfeljebb 5 korong helyezhető el egy lemezre, egymástól s lemez szélétől 24 mm távolságra, az érzékeny, tápigényes baktériumok esetében csak 4 (ld. CLSI/NCCLS M2-A8. Vol. 23 No.1 10. és 12.o.). Mivel a diszpenzerek 6 egymástól egyenlő távolságra lévő cartridges elhelyezésére szolgálnak, a fenti előírást csak a kiemelten fontos esetekben invazív infekció, érzékeny, rosszul növekvő baktériumok vizsgálatakor lehet és szükséges betartani.
- A felhelyezendő antibiotikum korongok fajtája és sorrendje baktérium és anyag típusonként változó. Egy adott anyagból izolált, adott species esetében a vizsgálandó antibiotikumok körét az aktuális, jelenleg a CLSI/NCCLS-M100-S15 és az ezt figyelembevevő Mikrobiológiai Körlevél fenti ajánlásai alapján a klinikusok igényeit, s a folyamatosan megújuló szakmai ismereteket is figyelembe véve a laboratórium diplomásai állítják össze.

Inkubáció

A korongok felhelyezése után a lemezeknek 15' elő-diffúziós idő után fedelükre fordítva termosztátba kell kerülniük.

- Az inkubációs hőmérséklet a CLSI által megadott $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ vagy a hazai gyakorlatban inkább elterjedt $35-37^{\circ}\text{C}$ ($36 \pm 1^{\circ}\text{C}$), kivéve a staphylococcusokat, amelyeknek methicillin rezisztenciája jobban kifejeződik, ha az inkubációs hőmérséklet $33-35^{\circ}\text{C}$ közé esik. A lemezeket általában normál légtérű termosztátban kell inkubálni. Emelt CO_2 tartalom esetén a táptalaj pH-ja megváltozik, s ez egyes antibiotikum csoportok diffúzióját befolyásolja. Az 5% CO_2 -os milióban jobban növekvő baktériumok esetében a CLSI/NCCLS a kontroll törzsek gátlási zónáit is 5% CO_2 -os közegben inkubálva adja meg.
- Az inkubáció időtartama általánosságban 16-18 óra. Kivételek: a staphylococcusok oxacillin és glikopeptid, az enterococcusok glikopeptid érzékenységének vizsgálatakor az inkubációs idő teljes 24 óra. A lassabban növekvő, érzékeny kórokozók, mint a *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* csoport speciesei és a *Neisseria meningitidis*, inkubációs ideje ugyancsak hosszabb, 20-24 óra (lásd. a CLSI M100-S15 2A-2D táblázatokban).

Értékelés

Az inkubációs idő letelte után az adott területen dolgozó diplomás „leolvassa” azaz értékeli korongdiffúziós antibiotikum érzékenységi vizsgálat lemezeit.

- Az értékelő megtekinti a lemezeket, megítéli, hogy a növekedés megfelelő sűrűségű, egyenletes-e, és az antibiotikum korong körül kialakult gátlási zónák éles határúak, szabályos kör alakúak és tiszták-e. Ha kettős gyűrűt vagy a gátlási zónán belül növekedést észlel, akkor az eredmény nem értékelhető (részletesen lásd később). A gátlási zóna szélén látható kis telepek elhanyagolhatók. Egyes *Proteus* speciesek esetében előfordulhat gyenge rajzás a gátlási zóna egy részén, ez nem befolyásolja az értékelést, s el lehet

tekinteni a szulfonamidot és ennek kombinációját tartalmazó antibiotikum korongok körül észlelhető gyenge növekedéstől, ha a növekedés 80%-ban gátolt.

- A diplomás, a lemez alján (vért tartalmazó táptalajok esetében felülről) leméri a gátlási zónák nagyságát mm-es beosztású vonalzóval vagy egyéb, erre a célra alkalmas eszközzel (tolómérő), s a kapott értékeket a vizsgálati anyag beküldő lapján, vagy ahhoz csatolt munkalapon rögzíti. Miután ez nagyszámú anyag esetében jelentős munkaidő többletet eredményez, a leolvasott érték rögzítése szükséges legkevesebb minden invazív anyagból származó izolátum, és ismert rezisztencia mechanizmust mutató antibiogram esetében. A 'leolvasó' a kapott mm értékeket a CLSI M100-S15 2A-2D jelzésű táblázatában a megadott range-nek megfelelően érzékeny: É, mérsékelten érzékeny: M, rezisztens: R kategóriába sorolja, és ezt a mm-érték mellett feltünteti.
- Az érzékenységi vizsgálat eredményét, az értékelést végző diplomás összeveti az identifikálás eredményével, megvizsgálja, hogy az identifikált speciesre jellemző természetes rezisztenciákat mutatja-e. Nem tartalmaz-e az eredmény nem lehetséges, vagy ritka rezisztencia genotípusokat. A lehetetlen genotípusok jegyzékét ld. a KJB IV. 5. és a CLSI M100-S15 4. táblázatában. A genetikailag lehetséges, de ritka rezisztencia fenotípus előfordulásakor a vizsgálat eredményének megerősítése szükséges, további fenotípusos vagy genotípusos vizsgálatokkal. (Referens laboratóriumba küldés szükséges).
- Az értékelő megvizsgálja, hogy egy antibiotikum csoporton belül a teljes vagy részleges keresztrezisztencia szabályai érvényesülnek-e. A rezisztencia kép alapján bizonyos szerzett rezisztencia mechanizmusok felismerhetők. Ezek igazolására további fenotípusos és/vagy molekuláris vizsgálatok szükségesek. (Az egyes rezisztencia mechanizmust mutató törzsek (MRSA, Ca-MRSA, ESB, MBL, VRE) közül, melyek küldendők az OEK-be további vizsgálatokra lásd az összeállítás végén.).
- A rezisztencia kép utalhat egyes indukálható rezisztenciák további vizsgálatának szükségességére is (*Staphylococcus aureus* D-test).

Hibaelhárítás, nem megfelelő eredmény

A hiba történhet a vizsgálat kivitelezése során bármelyik fázisban és az eredmény értékelésekor. Miután a korongdiffúziós vizsgálatnak számtalan hiba lehetősége van a cél az, hogy ezeket lehetőség szerint minimalizáljuk.

A hibák lehetnek technikai eredetűek, vagy származhatnak az értékelő szaktudásának hiányosságából.

I. A technikai eredetű hibák létrejöttének tárgyi, vagy személyi okai lehetnek, de ezek kombinálódhatnak is.

Tárgyi: pl. a felhasznált anyagok szennyezettsége, az eszközök meghibásodása, kalibrálás érvényességi idejének lejárta.

Személyi: az előírások be nem tartása, gondatlanság a kivitelezés során, gyakorlatlanság, a szakmai ismeretek hiánya.

a. Nem értékelhető az eredmény, ha a gátlási zónán vagy zónákon belül növekedés észlelhető.

Ennek oka lehet:

- *a szuszpenzió vagy a táptalaj szennyezettsége*, ilyen esetben több vagy minden érzékenységi vizsgálat érintett, amelynek készítésekor azonos táptalajt, vagy szuszpendáló oldatot használtak
- *a nem „tisztá” tenyészet*, vagyis a vizsgálat nem szintenyészetből való indítása, ez a hiba egy-egy baktérium vizsgálatnál fordulhat elő

- a baktérium populáción belül másodlagosan kialakuló rezisztens subpopuláció telepeinek megjelenése, (heterorezisztens) törzs leginkább a staphylococcusok oxacillin, az enterococcusok vancomycin érzékenységének vizsgálata során észlelhető.

Hibaelhárítás:

- a felhasznált táptalajok és a szuszpenzió készítéséhez használt oldat és eszközök sterilitásának felülvizsgálata szükséges. Vizsgálandó, hogy a minta szintenyészet volt-e?
- a vizsgálat új, kontrolált anyagokkal és eszközökkel, újabb 24 órás szintenyészetből megismétlendő.
- a gátlási zónán belül növekedő telepet, vagy tenyészetet ki kell szélesíteni, s a vizsgálatot a szélesztett és az eredeti törzs szintenyészetéből az identifikálással együtt meg kell ismételni. Ha a tiszta tenyészetből kiindulva ismételten észlelünk benövést a gátlási zónán belül, az itt megjelenő telepeket izoláljuk, a baktériumot az adott antibiotikummal szemben rezisztensnek értékeljük, s az izolált telepekből kapott tenyészetből lehetőség szerint további fenotípusos (pl. MIC, PBP2a) vagy egyéb a rezisztenciát megerősítő (molekuláris) vizsgálatot végzünk, ill. referens laboratóriumba küldjük.

b. Nem megfelelő az eredmény, ha a tenyészet ritka, a gátlási zónák túl nagyok, összefolynak, vagy a baktérium pázsit vastag, a gátlási zónák a szokásosnál kisebbek, nem szabályos kör alakúak.

Minden egyidejűleg végzett vizsgálat esetében tapasztalható a hiba.

Oka lehet:

- a nem megfelelő táptalaj használata (összetétel, pH, rétegvastagság, nedvesség tart.)
- a denzitóméter, termosztát meghibásodása,
- az előírt inkubációs idő be nem tartása,
- gyakorlatlanság vagy gondatlanság.

A hibát megerősíti, ha kontroll törzs átmérője CLSI/NCCLS M100-S15-3.- 3A táblázatában megadott értékhatárokon kívül esik

Nem minden egyidejűleg végzett vizsgálat esetén észlelhető a hiba.

Oka lehet:

- egyes antibiotikum korongok hatóanyag tartalmának csökkenése (a tárolás nem volt megfelelő, a megadott használhatósági ideje lejárt),
- egyes lemezek az előírt 4 mm-nél vastagabbak vagy vékonyabbak, vagy a felszínük egyenetlen,
- a kivitelezési eljárásban megadott egyéb időtartamok túllépése a lemezek egy részénél
- a szuszpenzió gondatlan beállítása,
- egyes lemezek felületének nem megfelelő leszárítása.

Hibaelhárítás:

5 egymást követő napon el kell végezni a kontroll törzsekkel a napi kontroll vizsgálatokat, lásd. (Quality Control Protocol Flow Chart lásd. NCCLS/CLSI M2-A8 Vol. 23 No. 1 Appendix A.) amennyiben, valamelyik eredmény nincs a range-ben, meg kell keresni a hiba okát:

- A kontroll törzsekkel ellenőrizni kell a táptalajt, megfelelő, „bevizsgált” táptalajjal a kontroll törzseket, továbbá a denzitómétert spektrofotometriával, vagy csiraszám meghatározással, a termosztát hőmérsékletét max-min. thermométerrel szükséges kontrollálni.
- Felül kell vizsgálni az antibiotikum korongok tárolási körülményeit, (hőmérséklet, nedvszívás) a lejáratú időket, a vizsgálatához használt, nem megfelelő eredményt adó

antibiotikum cartridges-t ill. a többi azonos lot számú cartridges-ből ismételt vizsgálatot kell végezni a kontroll törzsekkel. A lejárt, rosszul tárolt, és a kontroll törzsekkel végzett ismételt vizsgálatkor nem megfelelő korong lot-okat, amelyeknél gátlási zóna nagysága eltér a CLSI M100-S-15 3. és a 3A. táblázatában megadott range értékektől, a vizsgálatból ki kell zárni.

- A vizsgálatot végző személyek tevékenységének felülvizsgálata, a szakmai ismeretek felújítása
- A nem megfelelő vizsgálatokat új, kontrollált megfelelő táptalajjal, megfelelő hatóanyag tartalmú korongokkal, felülvizsgált denzitométerrel, és termosztáttal minden előírást maradéktalanul betartva meg kell ismételni.

II. Az értékelő szaktudásának hiányosságaiból adódó hibák:

- A fenotípusos kép alapján nem ismeri fel a különböző rezisztenciamechanizmusokat.
- Nem ismeri fel a rezisztencia szempontjából nem lehetséges vagy ritkán előforduló genotípusokat.
- Nem ismeri fel az érvényes keresztrezisztenciákat,
- nem veti össze az identifikálási és antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményét
- A vizsgálandó antibiotikumok körét nem jól választja meg,
- a kontroll vizsgálatokat nem végzi kellő gondossággal és gyakorisággal,
- nem ismeri, és nem tartja be a CLSI/NCCLS M100-S15, és M2-A8 előírásait,
- korongdiffúziós eljárással nem vizsgálható baktérium speciestek érzékenységét e módszerrel határozza meg,
- nem interpretálja az eredményeket.

Csak biztos, megalapozott szakmai tudással, az antibiotikum rezisztencia területén naprakész ismeretekkel rendelkező, és kellő gyakorlattal rendelkező diplomás képes az eredményeket megfelelően értékelni.

Az antibiotikum érzékenységi eredményt interpretálni kell.

Invazív vizsgálati anyagokból származó törzsek esetében minden esetben szükséges az eredményt értékelő diplomás konzultációja a klinikussal, amikor a klinikai tünetek ismeretében az interpretáció a konkrét esetre vonatkozóan kibővíthető.

Meghatározott esetekben a gátlási zóna nagysága alapján *in vitro* érzékenynek látszó baktérium speciést rezisztensként kell interpretálni, mivel egyes antibiotikumra vagy antibiotikum csoportra klinikailag nem bizonyulnak hatékonyak. A teljesség igénye nélkül, például:

- a β -laktamáz termelő Gram-pozítív speciesteket minden β -laktamázra érzékeny penicillin származékkal szemben a gátlási zóna nagyságától függetlenül, rezisztensnek kell kiadni.
- enterococcusok esetében, ha az ampicillin rezisztencia nem β -laktamáz termeléssel függ össze, ami gyakori, minden β -laktámmal szemben rezisztensnek kell kiadni, ugyanígy az ampicillin rezisztens β -laktamáz negatív *Haemophilus influenzae*-t, ami ritka.
- az enterococcusok HLAR „érzékeny” eredményét interpretálni kell, megjegyezve, hogy az aminoglikozidoknak csak szinergista hatása van.
- Néhány *Enterobacteriaceae*-be tartozó izolátum esetében a kezdetben érzékeny törzs gyorsan rezisztenssé válik a terápia során.

Pl. *Enterobacter*, *Citrobacter*, és *Serratia* spp-k a III. gen. cephalosporinokkal szemben, a staphylococcusok a quinolonokkal szemben, és a *Pseudomonas aeruginosa* minden antibiotikummal szemben. Ezekben az esetekben az eredményt kiegészítő megjegyzés: *a terápia 3-4 napját követően újabb vizsgálat indokolt.*

- az ESBL pozitív izolátumokra a β -laktám/ β -laktamáz gátló kombinációk, klinikai hatása bizonytalan. Így az érzékeny eredményt vagy ne adjuk ki, vagy megjegyzéssel közöljük.
- egyes antibiotikumok, pl. a clindamycin esetében gyakori indukciós rezisztenciát *Staphylococcus* és β -haemolizáló *Streptococcusok* esetében vizsgálni kell, s amennyiben erythromycin jelenlétében in vitro clindamycin rezisztencia indukálható, az eredményt rezisztensként interpretáljuk. (Megjegyezzük indukálható rezisztencia esetén, egyes izolátumok érzékenyek lehetnek)
- A CLSI M2-A8 szerint **félrevezető eredmények** lehetnek, s emiatt nem közölhetők az alábbiak:
 - az első, második gen. cephalosporinok és aminoglikozidok antibiotikum érzékenysége *Salmonella* és *Shigella* spp.
 - a cephalosporinok, aminoglikozidok (kivéve a high-level rezisztenciát), a clindamycin, és a trimethoprim-sulfamethoxazol *enterococcusok* és
 - a cephalosporinok *Listeria* spp. eseteiben.

Quality kontroll vizsgálatok

Kontroll törzsek: Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok kontrollját az CLSI által megadott ATCC törzsekkel kell végezni. Ugyancsak megadott ATCC törzsek használnak a különböző rezisztencia mechanizmusok vizsgálatához pozitív/negatív kontrollként. (1. számú táblázat).

1. táblázat Az aerob antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz szükséges kontroll törzsek

Törzs neve		ATCC azonosító	HNCMB azonosító
A táptalaj és korong ellenőrzéshez:			
<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton agar	25922	35053
<i>Escherichia coli</i>	Mueller Hinton agar	35218	35052
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mueller Hinton agar	25923	112011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mueller Hinton agar	27853	170554
<i>Enterococcus faecalis</i>	Magas aminoglikozid tartalmú korongok, thymidin-szint kontroll (trimethoprim, szulfonamid)	29212	80234
<i>Haemophilus influenzae</i>	BLNAR ampicillin rezisztens, β -laktamáz negatív	49247	94519
<i>Haemophilus influenzae</i>	ampicillin érzékeny	49766	94520
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GC agar + suppl.	49226	121008
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5% vértart. MH agar	49619	84001
A rezisztencia fenotipusos vizsgálatához, és a screen lemezekhez:			
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 μ g/ml, 4% NaCl tart. MH táptalajon oxacillin érzékeny	29213	112010
<i>Staphylococcus aureus</i>	oxacillin rezisztens	43300	112013
<i>Enterococcus faecalis</i>	aminoglikozid high level rezisztens 6 μ g/ml BHI vancomycin rezisztens	51229	80235
<i>Enterococcus faecalis</i>	aminoglikozid high level érzékeny	29212	80234

	6 µg/ml BHI vancomycin érzékeny		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL pozitív	700603	
<i>Staphylococcus aureus</i> MU50	VISA	700699	605618
<i>Staphylococcus aureus</i> MU43	hVISA	700698	606297
Macrolid indukálta clindamycin rezisztencia			
<i>Staphylococcus aureus</i>		BAA-976	
<i>Staphylococcus aureus</i>		BAA-977	

A táptalaj és antibiotikum tartalmú korong ellenőrzése

A CLSI által megadott ATCC törzsekkel vizsgálni kell minden új MH táptalaj sarzsot, s minden új beszerzésű antibiotikum tartalmú korong, minden lot-ját. Ennek módját a napi és heti QC vizsgálatok rendjét táblázatos formában összefoglalva közli a CLSI M2-A8 kiadványa.

Az *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 törzsszel kontrolláljuk a táptalaj megfelelő thymidine koncentrációját.

A kontroll törzsekkel a vizsgálandó táptalajon, vagy a megfelelő minősítésű táptalaj sarzsos, a vizsgálandó antibiotikum koronggal kapott gátlási zónák nagyságának mm-ben, a CLSI M100-S-15 3. és a 3A. táblázatában baktériumonként és antibiotikumonként megadott, alsó-felső határértékek közé kell esnie.

A referens vagy kontroll törzsek átoltásának gyakoriságát és tárolásának módját szemlélteti az a 2. számú melléklet ábrája

A kontroll törzsek átoltása és tárolása

- A rendszeres használathoz a kontroll törzs tenyészetét tárolhatjuk, egyrészt -82°C-on mélyhűtőben, másrészt folyékony nitrogénnel töltött tartályban. A mélyhűtött vagy nitrogénben tárolt tenyészetből legkevesebb mint havonta friss munkatenyészetet kell készíteni. Speciesenként egy kontroll törzset tartalmazó csövet kiemelünk, s felolvasztás után LA-ra, az érzékeny törzseket Cs-ra vagy V-ra oltjuk, majd 2 egymást követő napon a törzsekből subkulturát készítünk. Ezt követően FA vagy ferdített Cs-on, 2 °C -8 °C-on tároljuk a tenyészetet, a nem érzékenyeket legalább hetente, az érzékenyeket 48h-ként átoltva. Az átoltást egymást követően, legfeljebb 3 alkalommal végezhetjük el. A további vizsgálatokhoz a szükséges kontroll törzs mélyhűtött tenyészetének további csöveit használjuk. A mélyhűtőben, folyékony nitrogénben a hosszabb idejű tároláshoz stabilizátorokat kell használni, vagy a kereskedelemben kapható különböző Bacterial Reservation and Storage system csöveit gyöngyökkel és tároló folyadékkal, vagy házilag leggyakrabban 10-15%-nyi glicerolt tartalmazó táptalajba.
- Különös figyelmet igényelnek azok a törzsek, amelyeknek rezisztenciát kódoló génjei plazmidon helyezkednek el, melyeket a törzs spontán, könnyen elveszíthet. Pl. az *E.coli* ATCC 35218, vagy a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. .

Az antibiotikum tartalmú korongok tárolása:

- A bontatlan, antibiotikum tartalmú korongokat tartalmazó dobozokat eredeti csomagolásukban, a korong antibiotikum tartalmától függően hűtőben 5-7°C-on, vagy mélyhűtőben -14°C-on vagy ez alatt tároljuk. A **β-laktám tartalmúakat fagyasztva kell tárolni**, kivéve a használatban lévő kisebb mennyiséget, amelyet tárolhatunk hűtőben, de legfeljebb csak egy hétig. Néhány könnyen bomló hatóanyagot tartalmazó korongot, (pl.

meropenem, imipenem, cefaclor, és clavulánsav tartalmúak) célszerű a felhasználásig mélyhűtőben tartani.

- A korongokat tartalmazó tartályokat felnyitás nélkül, szobahőn kell tartani 1-2 óráig a felhasználás előtt. Így minimálissá tehetjük a hőmérséklet különbség hatására kialakuló kondenzációt.
- Amikor a korongokat tartalmazó kis tartályok (cartridges) zárt csomagolását megbontjuk, azonnal szorosan záródó nedvszívót tartalmazó tartályba kell helyezni, vagy az ugyancsak nedvszívóval ellátott szorosan záródó korongadagolóba (disc dispenser) kell beilleszteni. Az adagolókat használaton kívül ugyancsak hűtőben tároljuk, s használat előtt 1-2 óráig szobahőn tartjuk.
- Az indikátor színváltozásakor a nedvszívót ki kell cserélni, az elhasználtat regenerálni kell. Amennyiben az előírt regenerálási idő (50-55 °C 18- 24 óra) elteltével a nedvszívó színe nem nyeri vissza az eredeti színét, a nedvszívó továbbiakban nem használható fel!
- A korongokat csak a dobozon feltüntetett lejáratási időig (expiration date) lehet használni. Amennyiben a dobozból kivettük a cartridges-t és nem használjuk fel teljesen, a sarzs (Lot) jelet és lejáratási időt feltüntetve a 3. bekezdésben részletezett módon tároljuk.

Referenciák

1. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement 2005 Vol. 25 No.1 CLSI/NCCLS M100-S15, M2-A8.,
2. Murray R. P.(szerk.) Manual of Clinical Microbiology 8. edition ASM Press. Washington, D.C, 2003.
3. Czirók Éva (szerk.) Klinikai és Járványügyi Bakteriológia 1999.

1. számú melléklet

Korongdiffúziós vizsgálatra javasolt „antibiotikum sorok” kórokozó csoportonként

Enterobacteriaceae (szisztémás fertőzés)

Elsődlegesen vizsgálandó szerek:

- ampicillin vagy amoxicillin
- amoxicillin/clavulansav
- piperacillin/tazobactam
- cefotaxim
- ceftriaxon
- ceftazidim

- imipenem
- gentamicin
- amikacin
- tobramycin
- ciprofloxacin
- trimethoprim/sulfamethoxazol

Kiegészítő szerek:

(az alábbi antibiotikumok igény szerint)

- cefuroxim
 - cefepim
 - tetracyclin
 - levofloxacin
 - aztreonam
 - chloramphenicol
- polymyxin B (diagnosztikus)

Salmonella spp. és *Shigella spp.*

Székletből való izolálása esetén csak az alábbi szerek érzékenysége vizsgálandó, és csak indokolt esetben:

- ampicillin
- quinolonok
- trimethoprim/sulfamethoxazol

ESBL vizsgálat ajánlott!

extraintestinális izolátumok esetén a továbbiak:

- chloramphenicol
- 3. gen. cefalosporinok

Enterobacteriaceae (húgyúti infekció)

- trimethoprim/sulfamethoxazol

- ciprofloxacin
- norfloxacin vagy ofloxacin
- nalidixinsav
- nitrofurantoin
- ceftibuten

igény szerint

- ampicillin vagy amoxicillin
- amoxicillin/clavulansav
- cefuroxim
- gentamicin

diagnosztikus: polymyxin B

ESBL vizsgálat ajánlott!

Pseudomonas aeruginosa

piperacillin/tazobactam

- imipenem
- meropenem
- ceftazidim
- cefepim

- ciprofloxacin
- levofloxacin
- tobramycin
- gentamicin
- amikacin

multirezisztencia esetén kiegészítendő:

- aztreonam
- polymyxin B vagy colistin (MIC vizsgálat!)

metallo- β -laktamáz E-test-el való vizsgálata ajánlott

Acinetobacter calcoaceticus –Acinetobacter baumannii komplex

- ampicillin/sulbactam
- piperacillin/tazobactam
- imipenem
- meropenem
- ceftazidim
- cefepim

- amikacin

- gentamicin
- tobramycin
- ciprofloxacin
- trimethoprim/sulfamethoxazol

Burkholderia cepacia

Vizsgálható, mint a *P. aeruginosa*, de a CLSI szerint csak az alábbiakat ajánlott közölni:

- ceftazidim
- meropenem
- tetracyclin
- trimethoprim/sulfamethoxazol

Stenotrophomonas maltophilia

Vizsgálható, mint a *P. aeruginosa*, de a CLSI szerint csak az alábbiakat ajánlott közölni:

- trimethoprim/sulfamethoxazol
- levofloxacin
- minocyclin (tetracyclin)

Haemophilus influenzae*:

{ táptalaj HTM (Haemophilus Test Medium), direkt szuszpenzió, inkubálás: 5% CO₂-os közegben 16-18 óra }

- ampicillin és (β-laktamáz-teszt)
- cefixim
- tetracyclin
- ciprofloxacin
- levofloxacin
- moxifloxacin

***Haemophilus influenzae* (liquorból izolált)**

- ampicillin
- ceftriaxon
- meropenem
- chloramphenicol

Csak surveillance célból

- amoxicillin/ clavulansav
- clarithromycin
- azithromycin
- cefaclor
- cefpodoxim
- cefuroxim axetil (per os)

*Meg kívánjuk jegyezni, hogy a *H. influenzae* antibiotikum rezisztencia vizsgálatához használható táptalajokról nem alakult ki nemzetközi szakmai konszenzus. A CLSI által javasolt HTM agart nem mindenki tartja megfelelőnek /1-3/ ugyanakkor más táptalajt sem tudunk egyértelműen ajánlani helyette. A helyzetet jól tükrözi, hogy a tekintélyes BioMérieux cég VITEK típusú automata készülékén nem tette lehetővé *H. influenzae* antibiotikum rezisztencia vizsgálatok végzését. A CLSI is kommentárt fűzött a *H. influenzae* rezisztencia vizsgálatokhoz, amelyben megjegyzi, hogy számos antibiotikum esetében a korong diffúziós testnek korlátai vannak. Véleményünk szerint a HTM táptalaj nem optimális a *H. influenzae* növekedéséhez, ezért az antibiotikum rezisztencia vizsgálati eredmények érzékenységet mutathatnak olyan esetekben is, amikor a MIC érték a breakpoint felett található. A HTM táptalajon történő vizsgálat valószínűleg csak magasabb szintű rezisztencia detektálására alkalmas. Mivel tökéletes megoldást nem tudunk ajánlani, rendkívül fontosnak érezzük, hogy az ampicillinnel – mint a klinikai gyakorlatban legtöbbször használt antibiotikummal szemben – a rezisztenciát a lehető legpontosabban határozzuk meg. Jól ismert, hogy a *H. influenzae* leggyakrabban beta-laktamáz enzim termelése révén válik ampicillinnel szemben rezisztenssé, ezért minden esetben – az ampicillin korong átmérőjétől függetlenül – el kell végezni a cefináz testet.

1./ Mendelmann et al.: Problems with current recommendations for susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, 34, 1840-44.

2./ Fuchs et al.: Influence of variations in test methods on susceptibility of *Haemophilus influenzae* to ampicillin, azithromycin, clarithromycin, and telithromycin. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 43-46.

3./ Barry et al.: Identification of beta-lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* with four methods and eight media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 1585-88.

Neisseria meningitidis

Standard a MIC vizsgálat!

Invazív infekcióból származó törzsek esetében a MIC vizsgálat indokolt

24 órás csokoládé agarról direkt szuszpenzió, a táptalaj: Mueller-Hinton agar 5% birka vérrel kiegészítve) (CLSI 2005 Table 2L)

Inkubálás 5% CO₂-os közegben, 20-24 óra)

- penicillin (β-laktamáz-test is)
- ampicillin
- cefotaxim
- ceftriaxon
- meropenem
- chloramphenicol

profilaktikus célból

- ciprofloxacin
- levofloxacin
- rifampicin
- trimethoprim/sulfamethoxazol

Neisseria gonorrhoeae

A korongdiffúzióhoz táptalaj GC agar (Thayer Martin Medium) 1% növekedési supplementtel) (CLSI 2005 Table 2F)

Direkt szuszpenzió

Inkubálás: 5% CO₂-os közegben, 20-24 óra,

- penicillin (β-laktamáz-test is)
- ampicillin
- ceftriaxon
- ciprofloxacin
- tetracyclin

Staphylococcus spp.:

Direkt szuszpenzió, inkubáció: 33-35° C, 16-18 óra, oxacillin és vancomycin esetében 24 óra

- penicillin
- cefoxitin 30μg-os (diagnosztikus)
- oxacillin 1μg-os
- erythromycin
- clindamycin (erythromycin korongtól 15-26 mm-re) D-teszt
- trimethoprim/sulfamethoxazol

- ciprofloxacin
- gentamicin

- tetracyclin
- vancomycin
- linezolid
- rifampicin

Igény szerint

- quinupristin/dalfopristin
- daptomycin
- telithromycin
- mupirocin
- Ca-MRSA gyanújakor: fuzidinsav

Staphylococcus spp.:(vizelet)

penicillin (vagy β -laktamáz-teszt)

- oxacillin 1 μ g
- cefoxitin 30 μ g-os (diagnosztikus)
- erythromycin
- clindamycin
- trimethoprim/sulfamethoxazol

- ciprofloxacin
- norfloxacin
- nitrofurantoin
- novobiocin (diagnosztikus)
- tetracyclin
- gentamicin

Ha-MRSA esetében:

- vancomycin
- rifampin
- linezolid
- quinupristin/dalfopristin

β -haem. *Streptococcus spp.*

Direkt szuszpenzió, 5% vértartartalmú. Mueller-Hinton agar, 20-24 óra)

- penicillin
- erythromycin
- clindamycin (D-teszt)

Diagnosztikus: bacitracin

Csak súlyos, generalizált folyamatokban:

- vancomycin

- chloramphenicol
- linezolid
- quinupristin/dalfopristin
- daptomycin (komplikált bőr infekciók esetében)
- mupirocin (lokálisan)

Streptococcus pneumoniae

(Direkt szuszpenzió, 5% vértartalmú Mueller-Hinton, inkubálás: 5% CO₂ légkörben, 20-24 óra)

– oxacillin 1µg!
(nem adjuk ki, csak a penicillin érzékeny és nem érzékeny törzsek differenciálására használjuk), ha ≥ 20 mm, a törzs penicillin érzékeny, ha az oxacillin ≤ 19 mm, a penicillin MIC értékének meghatározása szükséges.

- erythromycin
- clindamycin
- levofloxacin
- moxifloxacin
- sulfamethoxazol/trimethoprim
- ampicillin (penicillinre mérsékelten érzékeny törzsek esetében MIC meghatározás szükséges)
- cefuroxim (MIC meghatározás, mint az ampicillin esetében)
- cefpodoxim (MIC meghatározás, mint az ampicillin esetében)
- vancomycin (MIC meghatározás)
- telithromycin
- linezolid
- tetracyclin

Invazív mintából: liquorból származó törzs esetén a ceftriaxon, cefotaxim, meropenem, egyéb anyagból a +vancomycin érzékenység meghatározáshoz feltétlenül MIC vizsgálat végzése szükséges

Enterococcus spp.

Direkt szuszpenzió, Mueller-Hinton agar

Inkubáció: vancomycin, teicoplanin = 24 óra

penicillin vagy ampicillin (+ β -laktamáz meghatározás)

- gentamicin 120 µg, (ha mérsékelt, 7-9 mm MIC meghatározás szükséges)
- vancomycin (érzékenység vizsgálata biztosan csak MIC érték meghatározásával lehetséges)

Minden izolált enterococcus törzs esetében a VRE szűrésére 6 µg/ml vancomycin tartalmú screen lemez használata ajánlott!

Invazív infekcióban kiegészítésként:

- linezolid
- quinupristin/ dalfopristin (az *Enterococcus faecalis* a szerre nem érzékeny)
- streptomycin 300 µg (csak, ha gentamicin High-Level rezisztens)

(vizeletből származó törzseknél)

- ciprofloxacin
- levofloxacin
- norfloxacin
- tetracyclin

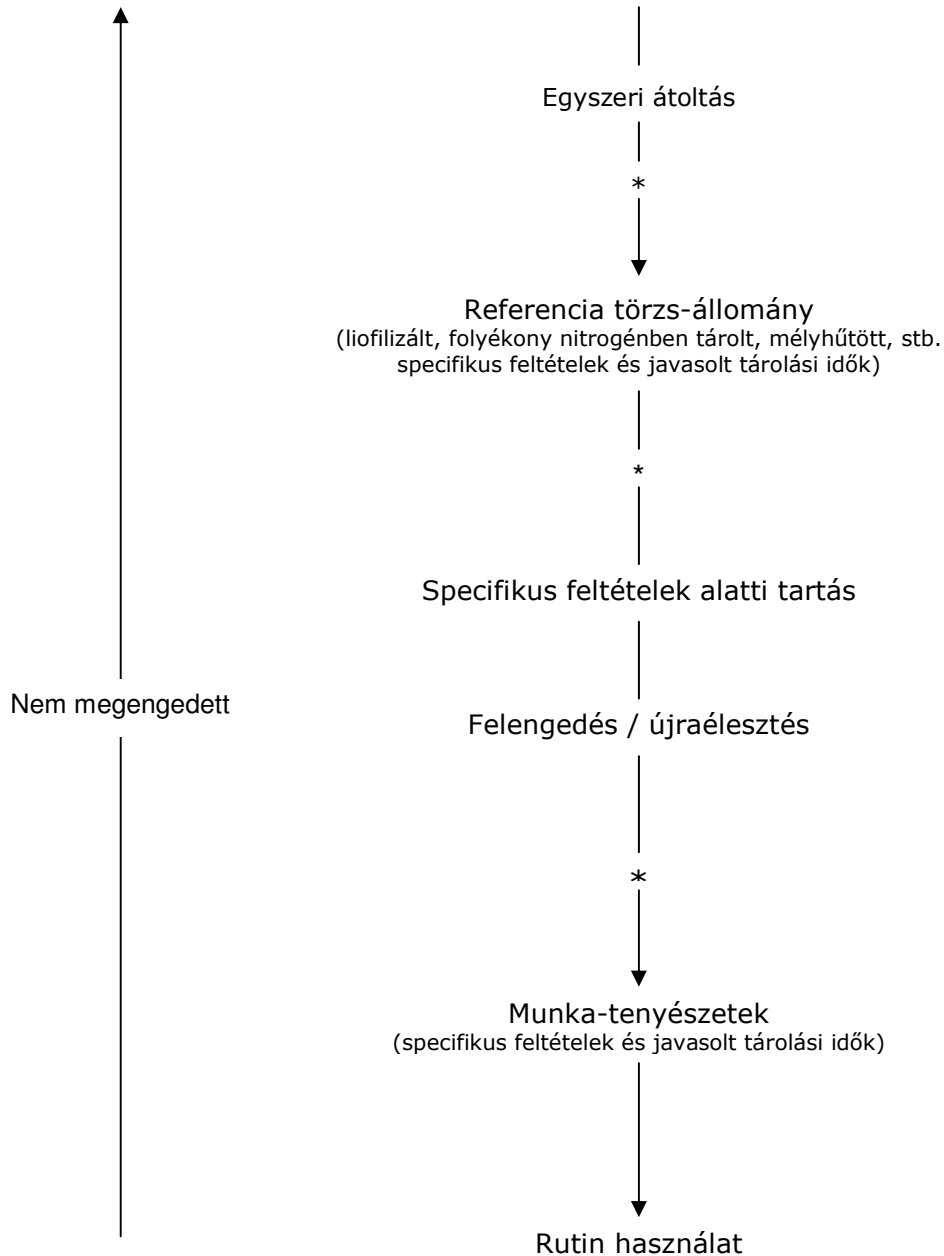
Campylobacter spp.

Ajánlás. Irodalmi közlemények alapján, ha nagyon szükséges leves hígítással végzett MIC meghatározás adhat támpontot

2. számú melléklet

A referencia törzsek általános használata

Egy elismert akkreditáló testülettől származó referencia törzs



*Párhuzamos tisztasági ellenőrzés és biokémiai tesztek, amennyiben indokolt.

A folyamat minden elemét teljesen dokumentálni kell, és adatrögzítőn meg kell őrizni.

***Stenotrophomonas maltophilia* antibiotikum érzékenységi vizsgálatának nehézségei**

Kristóf Katalin

A *S. maltophilia* az elmúlt évtizedben egyre nagyobb jelentőséget kapó nem fermetáló opportunistá patogén, mely bizonyos betegcsoportokban (cystikus fibrózisban szenvedők, malignus betegségek, intenzív ápolás, lélegeztetés, stb.) kolonizációt, nehezen kezelhető infekciót okoz.

Jellemzően természetes rezisztenciával rendelkezik karbapenemekkel szemben, és rendkívül könnyen rezisztenssé válik számos egyéb antibakteriális szerrel szemben is. Kromoszómáisan kódolt, indukálható β -laktámázok (L_1 Zn-dependens metallo-proteázok és L_2 cefalosporinázok) felelősek a β -laktámokkal szembeni rezisztenciájáért; külső membrán proteinek mennyiségi és minőségi változása a kinolonokkal szembeni; bontó enzimek termelése, hőmérsékletfüggő külső membránváltozás, csökkent felvétel az aminoglikozidokkal szembeni rezisztenciájáért; és számos, akár egyedi MDR-efflux rendszer az antibakteriális szerek széles spektruma ellen.

A rutin mikrobiológiai vizsgálatok során, ha a leggyakrabban alkalmazott korongdiffúziós módszerrel, 24 órás inkubálás után értékeljük az antibakteriális rezisztencia vizsgálataink eredményeit, fenotípusosan számos rezisztencia mechanizmus nem ismerhető fel, s súlyos, ún. major hibát követhetünk el. Jelenleg a pontos, species-szintű identifikálás mellett javasolt (NCCLS/CLSI 2005) antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok a következők:

1. **Korongdiffúziós módszerrel** Mueller-Hinton táptalajon 0,5 McFarland-sűrűségű direkt szuszpenzióból, vagy elődúsítás után, 20-24 órás 35 ± 2 °C-os inkubálás után a **levofloxacin** és **trimethoprim/sulfametoxazol** és **minocyclin** interpretálható a táblázatban szereplő zónaátmérők alapján.
2. Kationnal kiegészített Mueller-Hinton levesben végezve **leveshígítós** módszerrel, vagy Mueller-Hinton agaron **agarhígítós** módszerrel 0,5 McFarland-sűrűségű direkt szuszpenzióból, vagy elődúsítás után, 16-18 órás 35 ± 2 °C-os inkubálás után az elsőként vizsgálandó **trimethoprim/sulfametoxazol, tetracyclin és moxalactam** mellett **piperacillin/tazobactam, ceftazidim, cefepim, cefoperazon, aztreonam, aminoglikozidok, polymyxin B** és **flurokinolonok** MIC értékei vizsgálandók és interpretálandók.

A terápiás lehetőségek igen szűkösek, gyakran retrospektív vizsgálatokon, tapasztalati tényeken alapul. Kevésszámú klinikai vizsgálat történt, melyek földrajzilag különböző helyekről származnak, sokszor összehasonlíthatatlan betegcsoportokon, ezekből egyértelmű konklúziót levonni nem lehet. Továbbra is a trimethoprim/sulfametoxazol számít „drug of choice”-nak, bár a rezisztencia nő ellene. A ceftazidim csak néhány törzsre jó, ígéretesnek tűnnek az újabb fluorokinolonok. A még hatékonynak tűnő moxalactam és ticarcillin/klavulánsav Magyarországon nem elérhető.

Kiegészítés:

Nemzetközi adat *S. maltophilia* (2076 törzs vizsgálata 1997-2003 között) érzékenységéről (Int J Antimicrob Agents 2005;25:95-109)

	érzékeny		érzékeny		érzékeny
amikacin	16,80%	ciprofloxacin	30,90%	ceftazidim	52,90%
gentamicin	13,90%	levofloxacin	86,10%	polymyxin B	67,60%
trimethoprim/sulfametoxazol	95,30%				

Országos összehasonlító és referencia vizsgálatok céljára az OEK Bakteriológia I és II osztályra beküldendő izolátumok jegyzéke

A korábbi gyakorlatnak megfelelően továbbra is kérjük:

- az invazív fertőzésekből (haemocultura, liquor) izolált MRSA, ESBL termelő Enterobacteriaceae, *Streptococcus pyogenes* és *Streptococcus pneumoniae* törzsek beküldését,
- ugyancsak kérjük a bármely mintából kitenyésztett VRE és metallo- β -laktamáz termelésre gyanús *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter sp.* törzsek beküldését,
- nosocomiális járványból izolált MRSA és ESBL termelő Enterobacteriaceae törzsek (a járványt indító első izolátumok, és az invazív, seb, mélylégúti mintákból, valamint a járványhoz kapcsolódó higiénés mintákból származó izolátumok) beküldését,
- CA-MRSA gyanús (kitöltött „Közösségi (CA) MRSA fertőzési adatlap”-ok kíséretében), valamint járóbeteg szakellátásból származó ESBL-termelő Enterobacteriaceae törzsek beküldését,
- csökkent vancomycin érzékenységgű *S. aureus* törzsek beküldését

a Bakteriológia I osztályra.

Valamint kérjük:

- az invazív mintákból izolált *E. coli* törzsek,
- a véres, nyákos hasmenésből, vagy a 3 éves kor alatt hasmenésből izolált *E. coli* törzsek

beküldését a Bakteriológia II osztály Enterális Nemzeti Referencia Laboratóriumába.

Szeretnénk hangsúlyozni, hogy az említett törzsek vizsgálata járványügyi érdeket szolgál és semmilyen költségvonzata nincs a beküldő részére.

Ugyanakkor, mint már korábban is említettük, a nem invazív mintákból származó sporadikus MRSA és ESBL termelő izolátumok vizsgálatát nagy számuk miatt már nem tudjuk elvégezni.